

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Lentivirale Vektoren und RNAi für den Einsatz in der  
Xenotransplantation**

von

**Diana Messow**

geboren Töpfer

aus Wittenberg

2014

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Alexander Pfeifer betreut und von Herrn Prof. Dr. Martin Biel von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

### Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 11.10.2013

.....  
Diana Messow

Dissertation eingereicht am:

11.10.2013

Gutachter:

Prof. Dr. Martin Biel

2. Gutachter:

Prof. Dr. Alexander Pfeifer

Mündliche Prüfung am:

07.01.2014

## Danksagung

Ich möchte mich bei meiner Familie für die jahrelange Unterstützung bedanken und für das von ihnen entgegengebrachte Verständnis. Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann, der mich stets bei all meinen Entscheidungen unterstützt hat und es mir somit ermöglicht hat, diese Arbeit in München und Bonn zu beenden. Ich möchte mich bei meinen Eltern und Schwiegereltern bedanken, ohne deren Antrieb ich sicher nicht durchgehalten hätte. Danke Enrico, Danke Robert, das ihr beide immer für mich da wart.

Ganz besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Alexander Pfeifer bedanken. Vielen Dank für die sehr gute Betreuung und Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit und die Chance, an der fortwährenden Begeisterung der Arbeitsgruppe an der Forschung teilhaben zu dürfen.

Vielen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Martin Biel für die Übernahme des Erstgutachtens. Prof. Dr. Eckhart Wolf und Dr. Barbara Kessler möchte ich herzlich für die stete Zusammenarbeit zur Generierung transgener Schweine danken.

Vielen Dank an Prof. Dr. Reinhard Schwinzer und an Annegret Plege der MH Hannover für die Kooperation zur Untersuchung der Abstoßungsreaktionen transgener Schweinezellen.

Ich danke meinen Arbeitskollegen in Bonn für die intensive und unterstützende Zusammenarbeit im Labor und für die vielen privaten Stunden und die Freundschaften, die daraus hervorgegangen sind. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Andreas Hofmann für die steten Planungen und Diskussionen und die Gewissheit dass wirklich alles funktionieren kann. Auch gilt mein Dank Dr. Katrin Zimmermann für die sehr gute Zusammenarbeit und in der Endphase für die Projektübernahme und die Korrekturlesungen.

Vielen Dank an meine Labormitstreiter Tiongti Lim, Beate Syttkus, Katja Jennißen, Katharina Hennecke und Bodo Haas. Stefanie Kipschull, Jutta Müllich, Daniela Scholz, Christina Stichnote und Maike Schulte möchte ich herzlich danken für die tatkräftige Unterstützung, der Meisterung aller Laborwidrigkeiten und der vielen gemeinsamen Mittagsstunden.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Christopher Fügemann für die Drahtesel-Erkundung eines der schönsten Gebiete Deutschlands bedanken.

Ich danke besonders dem Eifrigen Studenten Neubiberg und allen Mitgliedern der Außenstelle Bonn für die fantastische Zeit. Vielen Dank an meine besten Freundinnen Michaela Klemm, Heide Lüttich und Mirjam Hug für die Unterstützung und Korrektur.

Zuletzt möchte ich mich bei allen für die Erfahrungen und für die gemeinsame Zeit bedanken, welche hier namentlich nicht extra bedacht werden konnten.

Erklärung .....	2
Danksagung .....	3
Abkürzungen .....	7
Zielsetzung der Arbeit .....	12
1. Einleitung .....	13
1.1. Lentiviren .....	13
1.2. Entwicklung Lentiviraler Vektoren .....	17
1.3. RNAi und shRNA .....	18
1.4. Xenotransplantation .....	20
1.5. $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase .....	21
1.6. Multitransgene Lentivirale Vektoren .....	22
1.7. Generierung transgener Schweine .....	23
2. Material und Methoden .....	25
2.1. Chemikalien und Lösungen .....	25
2.2. Geräte .....	25
2.3. Design der short hairpin Oligonukleotide .....	26
2.3.1. Ermittlung der Sekundärstruktur .....	26
2.3.2. siRNA Design .....	26
2.3.3. shRNA Design .....	27
2.4. Molekularbiologische Klonierungs-Methoden .....	27
2.4.1. Annealing von shRNA Oligonukleotiden .....	27
2.4.2. Phosphorylierung von shRNA Oligonukleotiden .....	28
2.4.3. Restriktionsverdau von DNA .....	28
2.4.4. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	28
2.4.5. Auffüllen von DNA-Enden nach Restriktionsverdau .....	29
2.4.6. Agarose Gelelektrophorese .....	29
2.4.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	30
2.4.8. Ligation .....	30
2.4.9. Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> XL-1 Blue .....	31
2.4.10. Transformation in chemisch kompetente <i>E.coli</i> XL-1 Blue .....	31
2.4.11. Plasmid-DNA Minipräparation .....	32
2.4.12. Plasmid-DNA Maxipräparation .....	32
2.4.13. Amplifikations PCR .....	33
2.4.14. Semiquantitative PCR .....	34
2.4.15. Sequenzierung .....	34
2.5. Shuttleplasmide und Virusplasmide .....	35
2.6. Klonierung shRNA-codierender Virusplasmide .....	35
2.7. Klonierung multitransgener Virusplasmide .....	37
2.8. Zellkultur .....	41
2.8.1. Zellen .....	41
2.8.2. Split .....	41
2.8.3. Immortalisierung von Zellen .....	42
2.8.4. Einfrieren von Zellen .....	42
2.8.5. Auftauen von Zellen .....	42
2.8.6. Transfektion von Zellen mit tsCR1 codierenden Plasmiden .....	43
2.9. Rekombinante Lentiviren .....	43
2.9.1. Generierung rekombinanter Lentiviren .....	43
2.9.2. Bestimmung des Virustiters/ELISA .....	45



2.9.3. Transduktion mit Virus .....	45
2.10. Molekularbiologische Analyse-Methoden .....	46
2.10.1. Generierung von Zellklonen.....	46
2.10.2. RNA-Isolation .....	46
2.10.3. cDNA-Synthese.....	47
2.10.4. Real-Time PCR .....	47
2.10.5. SYBR-Green PCR.....	49
2.10.6. tsCR1 Proteinisolation.....	50
2.10.7. Quantifizierung von Proteinen nach Bradford .....	51
2.10.8. Isolation genomischer DNA.....	51
2.10.9. Präparativer Restriktionsverdau genomischer DNA .....	52
2.10.10. Southern Blot.....	52
2.10.11. Northern Blot.....	55
2.10.12. Western Blot.....	57
2.10.13. Coomassie-Staining von SDS-Gelen .....	59
2.11. Funktionelle Analyse-Methoden .....	60
2.11.1. Lectin-Staining von Zellsuspensionen .....	60
2.11.2. Durchflusszytometrie .....	60
2.11.3. Mikroskopie .....	61
2.11.4. Sulforhodamin B Assay .....	61
2.11.5. Propidiumiodid-Assay.....	62
2.11.6. Chrom-Release .....	63
2.12. Generierung transgener Schweine.....	64
2.12.1. Ohrprobengewinnung und Organentnahme .....	64
3. Ergebnisse .....	65
3.1. Lentiviraler Knockdown der $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase .....	65
3.1.1. Analyse der $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA .....	65
3.1.2. siRNA Design .....	67
3.1.3. Screening der lentiviralen U6-shRNA Expressionskassetten .....	69
3.1.4. Optimierung der lentiviralen shRNA Konstrukte .....	70
3.1.4.1. Änderung der shRNA Kassette .....	70
3.1.4.2. Verwendung verschiedener Promotoren zur shRNA-Transkription.....	71
3.1.4.3. Änderung der Anzahl an shRNA Kassetten und Lokalisation im lentiviralen Vektor.....	73
3.1.5. Funktionelle Analysen der PSF Mischpopulationen.....	75
3.1.5.1. Zellwachstum transduzierter PSF Mischpopulationen.....	75
3.1.5.2. Mikroskopie transduzierter PSF Mischpopulationen.....	76
3.1.5.3. Durchflusszytometrie transduzierter PSF Mischpopulationen.....	77
3.1.5.4. siRNA Expression in transduzierten PSF Mischpopulationen.....	78
3.1.5.5. Lyse/Chrom-Release Assay .....	79
3.1.6. Generierung von Zellklonen.....	81
3.1.6.1. Bestimmung der Integrantenanzahl in den Zellklonen .....	81
3.1.6.2. Analyse der $\alpha$ GT mRNA Expression in den Zellklonen .....	82
3.1.6.3. Langzeitanalyse des $\alpha$ GT mRNA Knockdown in den Zellklonen.....	85
3.1.6.4. Mikroskopie der Zellklone .....	85
3.1.6.5. Analyse der $\alpha$ gal Epitope der Zellklone.....	87
3.1.6.6. Lyse der Zellklone.....	89
3.1.6.7. siRNA Expression in den Zellklonen.....	89
3.2. Kombination verschiedener Expressionskassetten im Lentivirus .....	90
3.2.1. Generierung multitransgener lentiviraler Vektoren .....	90

3.2.2. Nachweis der Transgenexpression per PCR .....	91
3.2.3. Nachweis des tsCR1 Proteins.....	94
3.2.4. Funktionelle Analysen der Einzel- und Doppeltransgen Vektoren.....	95
3.3. Generierung Transgener Schweine .....	98
3.3.1. Generierung und Geburt von Schweinen .....	98
3.3.2. Analyse der Integranten und Methylierungen.....	100
3.3.3. Funktionelle Analyse des transgenen Schweines 9833.....	106
4. Diskussion .....	109
4.1. Auf der Suche nach der shRNA mit dem höchsten $\alpha$ GT mRNA Silencing Potential	109
4.2. Mit U6-shRNA lentiviralen Vektoren zu Zellklonen mit stabiler shRNA Expression	112
4.3. Mit multitransgenen lentiviralen Vektoren zur verzögerten Abstoßungsreaktion.....	114
4.4. Generierung multitransgener Schweine als Endziel.....	116
4.5. Ausblick in die Zukunft.....	119
5. Zusammenfassung .....	122
6. Anhang .....	124
6.1. Sequenzen.....	124
6.1.1. $\alpha$ GT cDNA.....	124
6.1.2. tsCR1 cDNA .....	125
6.1.3. EndoGalC cDNA.....	126
6.1.4. FE2A cDNA .....	127
6.2. Tabellen.....	127
6.3. Plasmidkarten .....	132
6.3.1. pTZU6+1 .....	132
6.3.2. pBluescript .....	133
6.3.3. MTD-pAAV-MCS .....	133
6.3.4. pRRL.SIN-18 .....	134
6.3.5. pRSV Rev.....	134
6.3.6. pMDLg/pRRE .....	135
6.3.7. pMD2.G.....	136
6.3.8. pSilencer 1.0-U6.....	136
6.3.9. pRNA-U6.3/Neo .....	137
7. Literaturverzeichnis.....	138
8. Lebenslauf und Referenzen.....	145

## Abkürzungen

$\alpha$	alpha
A	Adenin
ad	auf genanntes Volumen auffüllen
$\alpha$ GT	$\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome, erworbenes Immundefektsyndrom
APS	Ammonium Peroxysulfat
ATP	Adenosin-Triphosphat
BES	<i>N,N</i> -bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonic acid
BBS	Bes Buffered Saline
$\beta$ -ME	$\beta$ -Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cytosin
CA	Capsidprotein
$\text{CaCl}_2$	Kalziumchlorid
CD	cluster of differentiation
CD35	Bezeichnung von CRPs (Bsp. CD35, 39, 46, 55, 59, 152)
cDNA	komplementäre, doppelsträngige DNA
CIP	Calf intestinal phosphatase
CMV	Cytomegalovirus Promoter
cPPT	central poplypurine tract
CRP	Komplement regulatorische Proteine
CR1	Complement receptor type I, CD35
CTLA4-Ig	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4, CD152
DAF	Decay accelerating factor, CD55
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium 61965 (Glutamax, Glucose, ohne Pyruvat)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxynukleotid-Triphosphat
(ds)RNA	(doppelsträngige) RNA

---

DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EndoGalC	Endo- $\beta$ -Galaktosidase C von <i>Clostridium perfringens</i>
<i>env</i>	envelope, Hüllmembranproteine kodierendes HIV-Gen
ET	Embryonaltransfer
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflußzytometrie
FBS	fetales bovines Serum
FITC	Fluorescein labeled Antibody
fw	forward, vorwärts gerichtet
G	Guanin
g	Gramm
<i>gag</i>	group-specific antigens, Strukturproteine kodierendes HIV-Gen
gp41	transmembranes Hüllmembran-Protein von HIV
gp120	an gp41 gekoppeltes Glykoprotein von HIV
GTKO	Galaktosyltransferase-knockout, GGAT <sup>-/-</sup>
h	Stunde
H1	humaner RNA H1 Promoter
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEK293T	immortalisierte humane, embryonale Nierenzellen
HIV	Human Immunodeficiency Virus, humanes Immundefizienzvirus
HRP	Horseradish peroxidase
IN	Integrase
KaAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knockout
LB+	lysogeny broth, Luria-Bertani Medium, Nährmedium inklusive Glukose
LTR	Long Terminal Repeat
LV	lentiviraler Vektor

---

M/mM	Molar/Millimolar
MA	Matrixprotein von HIV
mg/ml	Milligramm/Milliliter
min	Minute
mRNA	messenger RNA
µg/µl	Microgramm/Microliter
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Northern Blot
NC	Nucleocapsidprotein
<i>nef</i>	akzessorisches Gen von HIV
nm	Nanometer
NT	Nuclear Transfer, Kerntransfer
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid Gel Elektrophorese
PB	Primerbindungsstelle
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1	Receptor programmed cell death ligand 1
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin; 100 U/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin
PERV	Porcine endogene Retroviren
PFA	Paraformaldehyd
PGK	humaner Phosphoglycerat-Kinase Promoter
p.i.	post infection, nach Infektion (Transduktion)
pmol	Picomol
<i>pol</i>	Gene für die enzymatischen Aktivitäten bei HIV-1
PR	Protease
PVDF	Polyvinylidene fluoride
ψ	Psi, Verpackungssequenz für HIV-Produktion
R	redundante Region der LTRs von HIV
<i>rev</i>	regulator of expression, Transkriptionsregulator kodierendes HIV-Gen
rev	reverse, revers gerichtet

RISC	RNA-induced Silencing Complex, RNA-induzierter Silencing Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference, RNA-Interferenz
RNAse	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehung pro Minute
<i>RRE</i>	<i>rev</i> responsive element, <i>rev</i> Bindungsstelle
RRL	Backbone eines Lentivirus mit 3' SIN-Mutation
RSV	Respiratory Syncytial Virus
RT	Raumtemperatur
<i>RT</i>	Reverse Transkriptase, auch als Virus- <i>RT</i> bezeichnet
<i>RT</i> -PCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Spleißakzeptorstelle
SB	Southern Blot
sec	Sekunde
SD	Spleißdonorstelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA	short hairpin RNA, RNA mit Haarnadelstruktur
siRNA	small interfering RNA
SIN	self inactivating
SV40	Simian Virus 40
T	Thymin
TAg	Large Tumor Antigen von SV40
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TAR	trans-activation response, <i>tat</i> Bindungsstelle
<i>tat</i>	transactivator of transcription, Transkriptionsregulator kodierendes HIV-Gen
TBE	Tris-Borsäure-EDTA Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenethyamin
tg	transgen
TM	Thrombomodulin
Tris	Tris-(hydroxyethyl)-aminomethan
tsCR1	truncated soluble Complement Receptor 1
U	Uracil

U3	U3 Region der LTRs von HIV
U5	U5 Region der LTRs von HIV
U6	small nuclear human RNA Promoter
<i>vif</i>	akzessorisches Gen von HIV
<i>vpr</i>	akzessorisches Gen von HIV
<i>vpu</i>	akzessorisches Gen von HIV
VSV.G	Glykoprotein des Vesicular Stomatitis Virus
WB	Western Blot
Well	Loch, kleine Zellkulturschalen
WPRE	Woodchuck Hepatitis Virus Post-Transcriptional Regulatory Element
wt	Wildtyp
XL-1	<i>E.coli</i> Stamm

## Zielsetzung der Arbeit

Aufgrund der weltweiten Knappheit an Spenderorganen für die Transplantation war das Ziel dieser Doktorarbeit die Entwicklung von multitransgenen Schweinen als Transplantationsmodell. Die physiologischen Ähnlichkeiten der Organe von Mensch und Schwein bildeten hierfür die Grundlage. Größtes immunologisches Problem bei der Transplantation von artfremdem Gewebe, der Xenotransplantation, stellt die hyperakute Abstoßungsreaktion dar, hauptsächlich hervorgerufen durch die von der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase ( $\alpha$ GT) produzierten  $\alpha$ gal Epitope auf den Oberflächen der Schweinezellen.

Daher stellte das erste Ziel dieser Arbeit die Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope auf den Zelloberflächen der Schweinezellen dar. Dies sollte durch gezielte Herunterregulation der Genexpression der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mittels RNA Interferenz (RNAi) erreicht werden.

Durch Verwendung lentiviraler Vektoren (LV) zur Expression der RNAi-Kassetten sollte eine stabile Reduktion der Genexpression der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase erzielt werden. Desweiteren sollten lentivirale Vektoren zur Überexpression bestimmter Enzyme generiert und getestet werden, die zum einen die Abstoßungsreaktion selbst reduzieren (tsCR1, trunkierter löslicher Complementrezeptor 1) oder noch vorhandene  $\alpha$ gal Epitope von den Schweinezellen entfernen (EndoGalC, Endo- $\beta$ -Galaktosidase C). Durch die gezielte Kombination der lentiviralen Vektoren zur Expression von tsCR1, EndoGalC und siRNA-Kassetten sollten multitransgene Schweinezellen generiert und so letztlich einer immunologischen Abstoßungsreaktion entgegengewirkt werden. Im letzten Schritt sollten multitransgene Schweine generiert und auf Funktionalität der integrierten Gensequenzen hin untersucht werden. Dies wurde zum einen durch Transduktion von Schweinezellen mit Lentiviren und nachfolgendem Kerntransfer in kernlose Zygoten erreicht oder durch subzonale Injektion von Lentiviren in fertilisierte Oocyten. In beiden Fällen erfolgte ein Embryonaltransfer in pseudoschwangere Fostertiere, welche die transgenen Tiere austragen.

Durch die Kombination der zwei Methoden RNAi und Überexpression immunmodulatorischer Gene mittels lentiviraler Vektoren sollte somit ein weiterer Grundstein zur zukünftigen erfolgreichen Xenotransplantation gelegt werden, um der Organknappheit entgegen zu wirken.

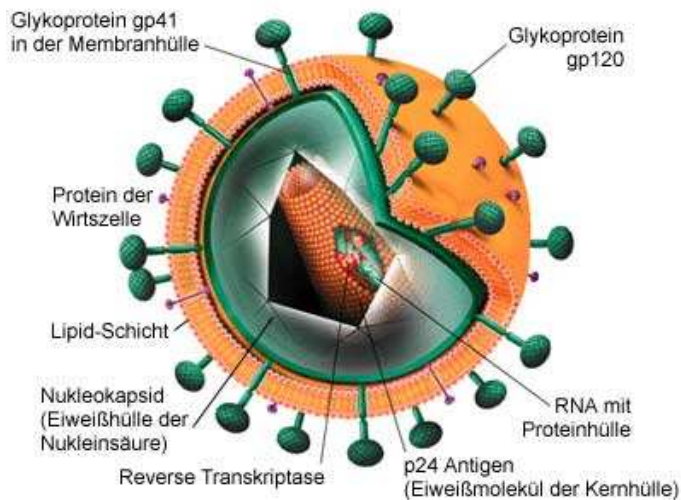


# 1. Einleitung

## 1.1. Lentiviren

Lentiviren, Spumaviren und Onkoviren bilden die drei Unterfamilien der Familie der Retroviren (Coffin 1990, Coffin 1992, Doolittle *et al* 1990, Shaunak und Weber 1992). Die *Retroviridae* sind Viren mit zwei identischen einzelsträngigen RNA-Genomen, welche mithilfe der Reversen Transkriptase (RT) in den Wirtszellen in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden, was der Familie den Namen verleiht (**R**everse **T**ranskriptase **O**nkoviren) (Coffin 1990). 1966 erhielt Peyton Rous den Nobelpreis für die Entdeckung des nach ihm benannten ersten Retrovirus, dem Rous-Sarkom-Virus, welches bei Geflügel Tumorerkrankungen hervorrufen kann (Rous 1911). Die Unterfamilie der Lentiviren (lat. Lentus, langsam) wurde 1983 durch die Identifikation der humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2 durch die Arbeitsgruppen von Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und Robert C. Gallo am National Institute of Health in Bethesda begründet (Gallo und Montagnier 1987). Seit der Erstbeschreibung 1981 (Barre-Sinoussi *et al* 1983, De Cock 2001) der durch HIV hervorgerufenen Immunschwäche AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) ist die Zahl der Menschen mit HIV-Infektion/AIDS weltweit auf 34 Millionen Menschen gestiegen (<http://www.aidshilfe.de/de/infothek/hiv-zahlen/weltweit>). Neben den humanen Lentiviren sind Lentiviren in Affen (SIV, Affen-Immundefizienzvirus), Katzen (FIV, Katzen-Immundefizienzvirus), Rindern (BIV, Rinder- Immundefizienzvirus), Schafen (VMV, Visna-Maedi-Virus), Pferden (EIAV, Infektiöses-Anämie Virus) und Ziegen (CAEV, Arthritis-Encephalitis-Virus) bekannt (Modrow 2010).

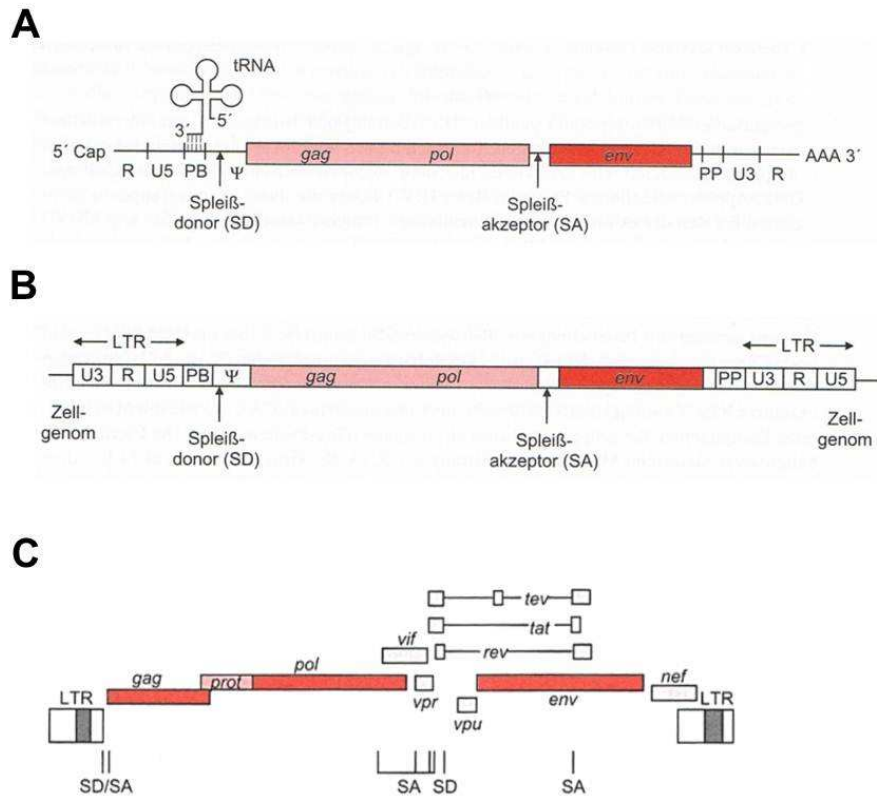
Das typische Lentivirus hat einen Durchmesser von ca. 100nm und ist von einer Hüllmembran mit externen (gp120) und transmembranen (gp41) Glykoproteinen umgeben (Abbildung 1). An der Innenseite der Hüllmembran sind Matrixproteine (p17) angelagert. Die beiden identischen einzelsträngigen RNA Moleküle sowie die Enzyme Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) sind mit Nukleokapsidprotein (NC) komplexiert und von Capsidproteinen (CA) in einem konischen Viruskapsidkern umschlossen (Abbildung 1).

**Abbildung 1**

**Schematischer Aufbau eines Lentiviruses am Beispiel von HIV-1. ([http://hiv-info.de/img/hiv\\_cut.jpg](http://hiv-info.de/img/hiv_cut.jpg))**

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA Molekülen, welche ähnlich der eukaryotischen mRNA eine 5'Cap-Struktur und eine ca. 200 Basen lange 3' Polyadenylierung aufweisen. Auf der retroviralen RNA ist die Information für die Gene *gag* (gruppenspezifische Antigene MA (Matrixprotein), CA, NC), *pol* (Enzyme RT, IN, PR) und *env* (Glykoproteine) codiert. Die codierenden Bereiche werden von Kontrollsequenzen flankiert und sind essentiell für den Lebenszyklus der Viren (Abbildung 2A): Direkt hinter der 5'Cap-Struktur liegt eine kurze R-Region (redundant), gefolgt von der U5-Region (unique) welche wichtige Sequenzen für die Provirus Integration in das Wirtsgenom aufweisen (Spriggs *et al* 2008). An der 18 Basen langen Primer-Bindungsstelle (PB) ist die tRNA für die Initiierung der Erststrang-DNA-Synthese gebunden. Die auf die PB folgende Leader-Region besteht aus der Spleißdonorstelle (SD), welche für die Produktion aller gespleißten mRNA Moleküle genutzt wird, und dem Verpackungssignal  $\Psi$ , welches Bindungsstellen für die Nukleokapsidproteine aufweist und dadurch die RNA-Verpackung im Viruskapsid bedingt (Berglund *et al* 1997, Clever *et al* 2000). Den codierenden Bereichen ist der Polypurintrakt (PP) nachgelagert, welcher die Zweitstrang-DNA-Synthese bei der reversen Transkription initiiert. Die nach dem PP folgende U3-Region ist beim HIV-1 ca. 450 Basen lang und enthält wie die U5-Region wichtige Sequenzen für die Integration des Provirus in das Wirtsgenom. Zusätzlich enthält die U3-Region Promotoren, *cis*-aktive Elemente sowie Enhancer-Elemente. Diese Bereiche sind für die Regulation der viralen Transkription und Genexpression verantwortlich. Während der reversen Transkription der einzelsträngigen RNA in die komplementäre doppelsträngige cDNA entstehen aus den RNA-flankierenden 5' (R-U5) und 3' (U3-R) Sequenzen die sogenannten Long-Terminal-Repeats

(LTR). Die LTRs, bestehend aus der U3-Region, R-Region und U5-Region, werden hierbei verdoppelt und flankieren nach Integration ins Wirtsgenom das integrierte Provirus (Kao *et al* 1987, Starcich 1985) (Abbildung 2B).



**Abbildung 2**

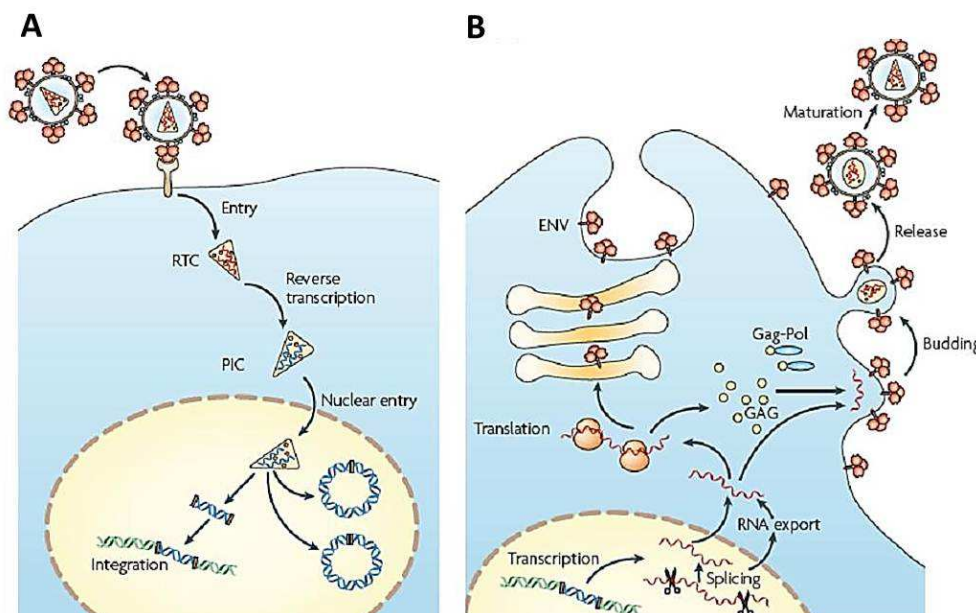
#### RNA-Genomorganisation des Retroviren und Proviren.

(A) RNA-Genom des infektiösen Partikels. (B) Provirusgenomorganisation nach Reverser Transkription und Integration ins Wirtszellgenom. (C) Genomaufbau von HIV-1 mit *gag*, *pol* und *env* Genen sowie den akzessorischen Genen *tat*, *rev*, *nef*, *vpr* und *vif*. Modrow 2010.

Neben den *gag*, *pol* und *env* Genen besitzt HIV-1 weitere regulatorische (*tat* und *rev*) und akzessorische (*vif*, *vpr*, *vpu* und *nef*) Gene (Abbildung 2C). *Tat*-Proteine (transactivator of transcription) verstärken die Transkription des LTR Promoters durch Bindung an das *TAR*-Element (trans-activation response) um mehr als das hundertfache (Gaynor 1995, Harrich *et al* 1996). *Rev* Proteine (regulator of expression of virion proteins) fungieren als posttranskriptionelle Transaktivatoren, welche essentiell für die zeitliche Regulation der Genexpression während eines Replikationszyklusses sind (Hope *et al* 1995). Die akzessorischen Proteine sind vor allem für die Virulenz der Lentiviren verantwortlich (Cullen *et al* 1991, Chinnasamy *et al* 2000). So beeinflusst das *vif* Protein (viral infection factor) die Infektiösität freigesetzter Viren (Volsky *et al* 1995, Kotler *et al* 1997). Es gibt Hinweise, das auch das *nef* Protein (negative factor) und das *vpu* Protein (viral protein out) die Virulenz der

Viren beeinflussen (Vermeire *et al* 2011, Jabbar 1995, Schubert *et al* 1996). Pro Viruspartikel sind ca. 100 vpr Proteine (viral protein rapid) eingelagert, welche die Virusreplikation und Ausbildung des zytopathischen Effektes bei der Wirtszellinfektion beschleunigen (Levy *et al* 1995).

HIV-1 Viren sind im Gegensatz zu den simpleren Oncoretroviren in der Lage auch sich nicht-teilende Zellen zu infizieren und weisen einen ausgeprägten Tropismus auf CD4-positive Zellen (T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen) auf (Berger *et al* 1999). Das virale gp120 bindet dabei an den CD4 Rezeptor und den Korezeptoren CCR5 oder CXCR4 (Chemokin-Rezeptor) und leitet so die Membranfusion zwischen Viruspartikel und Wirtszelle ein (Marsh und Helenius 2006, Wyatt und Sodroski 1998, Rizzuto *et al* 1998, Doms und Moore 2000). Nach Umschreiben des RNA-Genoms in die komplementäre doppelsträngige cDNA durch die Reverse Transkriptase wird der sogenannte Präintegrationskomplex (PIC) gebildet und in den Zellkern transportiert. Dort wird der doppelsträngige Provirus in das Wirtszellgenom integriert (Abbildung 3). Die viralen Gene werden durch die wirtszelleigene Maschinerie transkribiert, gespliced und die Viruspartikel reifen nach dem sogenannten Budding extrazellulär weiter und können neue Wirtszellen infizieren (Gottlinger *et al* 1989, Jacks *et al* 1988, Parkin *et al* 1992, Swanstrom *et al* 1997) (Abbildung 3).



**Abbildung 3**

**Schematischer Lebenszyklus der Retroviren am Beispiel HIV-1.** Modifiziert nach Goff *et al* (2007)

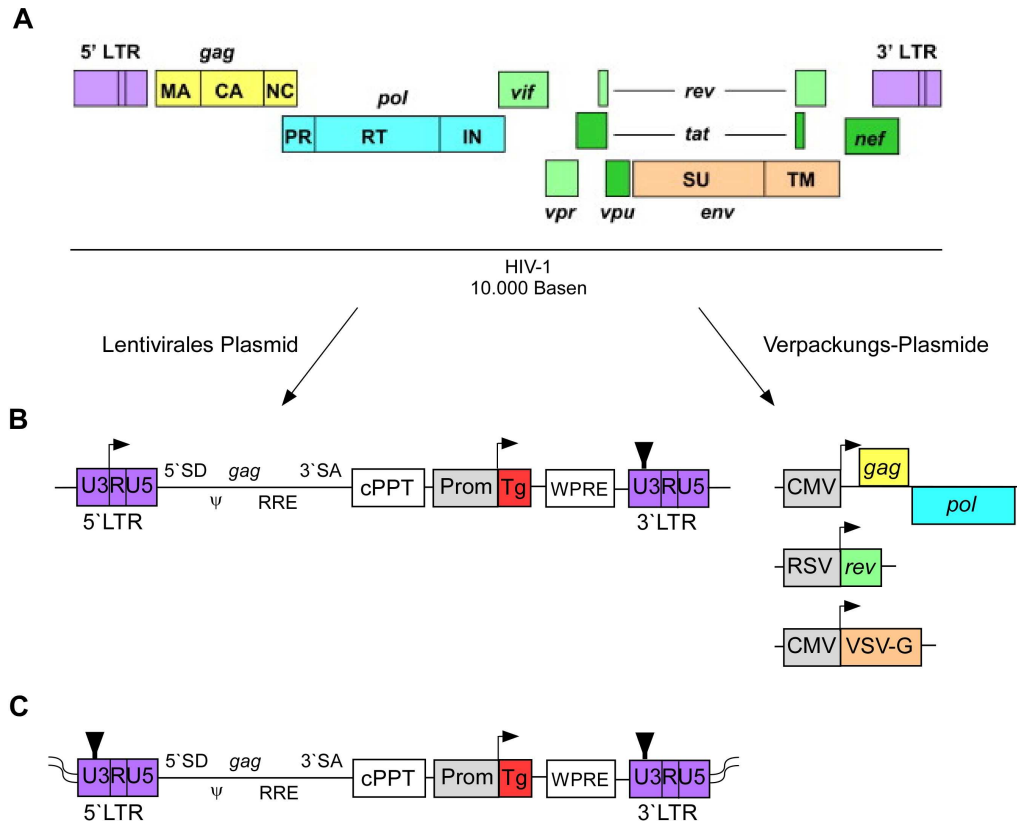
(A) Adsorption des Virus, reverse Transkription und Integration ins Wirtszellgenom. (B) Transkription, Translation, Bildung der Viruspartikel und Budding.

## 1.2. Entwicklung Lentiviraler Vektoren

Um Lentiviren mit der Eigenschaft der stabilen Genomintegration für die Forschung nutzbar zu machen, wurden die virulenten akzessorischen Gene aus dem lentiviralen Genom entfernt, die gewünschte Transgen-Expressionskassette eingebaut und die notwendigen Faktoren auf mehrere Plasmide aufgeteilt (Naldini *et al* 1996, 1998, 1999). Durch Transfektion von Helferzellen mit dem lentiviralen Plasmid und den Verpackungs- und Strukturplasmiden können somit lentivirale Vektoren mit den minimal nötigen viralen Komponenten (Kim *et al* 1998) und der gewünschten Transgenkassette gewonnen werden (Kafri *et al* 1999, Zufferey *et al* 1998, Lever *et al* 2004, Pfeifer und Verma 2001, Klages *et al* 2000). Die Vektoren wurden im Verlauf der Zeit weiterhin optimiert (Abbildung 4B):

Die *env* Gene des Wildtyp-Virus wurden durch das Gen für das G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) ersetzt, wodurch die Viren stabiler sind (Akkina *et al* 1996, McClure *et al* 1998), per Ultrazentrifugation aufgereinigt werden können (Naldini *et al* 1996) und Einfrier- und Auftauprozesse besser überstehen (Lever *et al* 2004). Zum anderen wurde dadurch der Tropismus der Lentiviren auf fast alle Zellen erhöht, da VSV-G pseudotypisierte Viren durch Bindung an Phospholipide per Endozytose in die Zelle gelangen (Kalajzic *et al* 2001, Burns *et al* 1993, Emi *et al* 1991, Aiken 1997). Von allen viralen Genen wurden letztlich nur *gag*, *pol* und *rev* behalten, codiert auf zwei separaten Verpackungsplasmiden (Zufferey *et al* 1998, Dull *et al* 1998, Kim *et al* 1998, Miyoshi *et al* 1998, Delenda *et al* 2004, Gasmi *et al* 1999). Das als lentivirales Plasmid bezeichnete Vektorkonstrukt beinhaltet alle *cis*-aktiven Sequenzen für Verpackung ( $\Psi$ ), reverse Transkription und Integration (LTR) sowie SD/SA, *RRE* und *gag* Bindestellen für die Transkriptionsregulation des integrierten Provirus (Delenda *et al* 2004). Für die Steigerung der Effizienz des Gentransfers fügte Zennou *et al* einen zentralen Polypurintrakt (cPPT) ein und Zufferey *et al* erhöhte die Transgen-Expression durch Integration des posttranskriptionell regulatorischen Elements des Woodchuck Hepatitis-Virus (WPRE) (Zennou *et al* 2001, Zufferey *et al* 1999). Auch die U3-Region des Lentiviruses wurde durch Entfernung der Promoter- und Verstärker-Elemente dahingehend verändert, das nach der LTR-Konversion während der reversen Transkription die U3-Region der 5'LTR keine transkriptionelle Aktivität mehr besitzt. Die lentiviralen Vektoren inaktivieren ihre Promoteraktivität während der reversen Transkription in den Provirus folglich selbst und Vektoren mit der Mutation in der U3 werden daher als selbst-inaktivierend bezeichnet (SIN, self inactivating viruses) (Iwakuma *et al* 1999, Kim *et al* 1998, Miyoshi *et al* 1998, Zufferey *et al* 1998). Durch dieses System können diverse

Transgenexpressionskassetten in das lentivirale Plasmid kloniert werden und die durch Helferzellen hergestellten stabilen Lentiviralen Vektoren für die Transduktion von teilenden und nicht-teilenden Zellen innerhalb eines großen Wirtsspektrums eingesetzt werden.



**Abbildung 4**

**Schematische Darstellung des Genomaufbaus von HIV-1 (A), der lentiviralen Plasmide und Verpackungsplasmide (B) sowie der integrierte Provirus (C).**

(A) Genomaufbau von HIV-1 mit *gag*, *pol* und *env* Genen sowie den akzessorischen Genen *tat*, *rev*, *nef*, *vpu*, *vpr* und *vif*. Modifiziert nach <http://ars.sciencedirect.com/content/image/1-s2.0-S0147957107000719-gr1.jpg> (B) Schematische Darstellung der Entwicklung lentiviraler Vektoren der dritten Generation. Das virale Genom wurde in Lentivirales Plasmid (links) und Verpackungs-Plasmide (rechts) unterteilt. (C) Schematische Darstellung des integrierten Provirus mit SIN Mutation. CMV Cytomegalovirus Promoter; ▼ SIN Mutation; Ψ Verpackungssignal; LTR Long Terminal Repeat; R redundant region; U unique region; Prom Promoter der Wahl; Tg Transgen der Wahl; *rev* und *tat* Regulatorische Gene; *vif*, *vpr*, *vpu* Akzessorische Proteine; *gag* Gruppenspezifische Antigene; *pol* Enzymatische Aktivität; VSV-G G-Protein des Vesicular Stomatitis Virus; SA und SD Spleißakzeptor und Spleißdonor; cPPT Zentraler Polypurintrakt; WPRE Regulatorisches Posttranskriptionelles Element des Woodchuck Hepatitis Virus.

### 1.3. RNAi und shRNA

Die RNAi (RNA Interferenz) ist ein evolutionär konservierter Mechanismus der Genexpressions-Regulation. Durch RNAi wird die Genexpression während der Entwicklung kontrolliert, es spielt eine wichtige Rolle in der gewebsspezifischen Genregulation und schützt v.a. Pflanzen und Wirbellose vor RNA Viren (Ullu *et al* 2004, Cibrián-Jaramillo *et al*

2009). Für die Entdeckung der sogenannten RNA Interferenz (RNAi) bekamen Andrew Fire und Craig Mello 2006 den Nobelpreis für Medizin verliehen. Fire *et al* injizierten dabei doppelsträngige RNA (ds RNA) in *C. elegans* und zeigten eine Minimierung der Genexpression (Gene Silencing, Knockdown) von Genen, welche komplementäre Bereiche zu den injizierten RNA Sequenzen aufwiesen (Fire *et al* 1998). Bei diesen RNA Molekülen handelte es sich um die sogenannten siRNAs (small interfering RNAs). Hierbei wird die doppelsträngige RNA (dsRNA) in Form einer short-hairpin RNA (shRNA) durch die Enzymatische Aktivität von DICER in kleine einzelsträngige 21 bis 23 Nukleotide (nt) lange RNA (ssRNA), den siRNA Fragmenten, prozessiert (Tijsterman *et al* 2004) (Abbildung 5). Mithilfe des RISC (RNA Interference Silencing Complex) werden die siRNAs an komplementäre mRNA Sequenzen angelagert und diese dadurch abgebaut (Hutvagner 2005, Dykxhoorn und Liebermann 2005, Agrawal *et al* 2003, Dykxhoorn *et al* 2003).



**Abbildung 5**

**Prozessierung der siRNA.**

(A) Schematische Darstellung der shRNA im doppelsträngigen Genom in der Orientierung antisense-loop-sense-Terminationssignal. (B) Haarnadelstruktur der shRNA nach Transkription. (C) siRNA nach Prozessierung. Der antisense siRNA Strang (rot dargestellt) ist komplementär zur mRNA des Zielgenes.

Neben den hier beleuchteten siRNAs gibt es auch sogenannte microRNAs (miRNAs), welche durch Bindung in der seed region in der 3'UTR von Genen zu einer verstärkten Degradierung des Transkripts und somit ebenfalls zur Reduktion der Proteinexpression führt.

Viele Forschergruppen haben sich mit der Entwicklung von siRNA Expressionssystemen beschäftigt (Tuschl und Borkhardt 2002). Zur shRNA Expression in Zellen werden am häufigsten die humanen RNA Polymerase III (Pol III) Promotoren U6 (small nuclear RNA U6) oder H1 (RNA H1) verwendet (Mäkinen *et al* 2006, Scherer 2004, Lee *et al* 2002, Brummelkamp *et al* 2002). Es konnte gezeigt werden, dass spezielle siRNA Eigenschaften wie z.B. Länge (Elbashir *et al* 2001, Kim *et al* 2005), Zusammensetzung der Basen (Reynolds *et al* 2004), GC-Gehalt (Heale *et al* 2005) oder Sekundärstrukturen (Zucker 2003, Mathews *et al* 2003).



*al* 2004) wichtige Parameter für erfolgreiches Silencing von Zielgenen darstellen (Schwarz *et al* 2003, Hofacker 2003, Harborth *et al* 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene designte siRNAs als shRNA hinter die gewählten Promotoren in lentivirale Plasmide kloniert und nach oben beschriebenen System lentivirale Vektoren generiert, die für die Transduktion von Zellen eingesetzt wurden. Die Kombination von RNAi und Lentiviralen Gentransfer in Zellen oder befruchtete Eizellen erlaubt eine stabile shRNA Expression und Gensilencing nicht nur in den infizierten Zellen (Rubinson *et al* 2003, Tiscornia *et al* 2003, Stewart *et al* 2003), sondern auch in kompletten Tieren (Pfeifer *et al* 2006, Dieckhoff *et al* 2007, Hofmann *et al* 2004, Rubinson *et al* 2003).

#### 1.4. Xenotransplantation

Aufgrund der ähnlichen anatomischen und physiologischen Eigenschaften der Organe von Mensch und Schwein bietet sich die Generierung transgener Schweine für die Übertragung von Zellen oder Zellverbänden bis hin zu ganzen Organen (Xenotransplantation) als Lösung für den momentanen Organspendemangel an. Viele Versuche wurden bereits unternommen, um die hyperakute Abstoßungsreaktion (HAR) der Schweinezellen zu verhindern. Bei der hyperakuten Abstoßung verursachen die körpereigenen Antikörper eine Aktivierung des Komplementsystems. Dies führt innerhalb von Minuten bis Stunden nach erfolgter Transplantation des fremden Organes zu Blockierungen des Blutflusses in den Organgefäßen, was letztlich zum Absterben des Transplantates führt. Die Überexpression von humanen Komplement regulatorischen Proteinen (CRPs) wie CD39, CD46, CD55 oder CD 59 (Cluster of Differentiation) konnten bereits in GGAT1<sup>-/-</sup> Schweinen (GTKO, homozygote  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase Knockout Schweine, siehe 1.5.) eingebracht und somit die hyperakute Abstoßung von Herz (Niemann und Kues 2003, Wu *et al* 2007, Mohiuddin *et al* 2011, Bauer *et al* 2011), Leber (Ezzelarab *et al* 2011, Ekser *et al* 2011 und 2012), Lunge (Nguyen *et al* 2010, *ex vivo*) und Niere (Lin *et al* 2010) minimiert werden. Eine Verzögerung der Abstoßungsreaktion von transplantierten Herzen in Affen konnte für 3-4 Wochen erreicht werden (McGregor *et al* 2011). Die Gruppe um Le Bas-Bernardet *et al* konnte transplantierte Nieren von Schweinen mit GTKO sowie Überexpression der komplementregulatorischen Proteine CD39/CD55/CD59 zwei Wochen vor einer Abstoßung in Affen bewahren (Le Bas-Bernardet *et al* 2011). Die Transplantation von dezellularisierten Hornhäuten von GTKO Schweinen in Rhesusaffen war in 80% der Eingriffe für mehr als sechs Monate erfolgreich



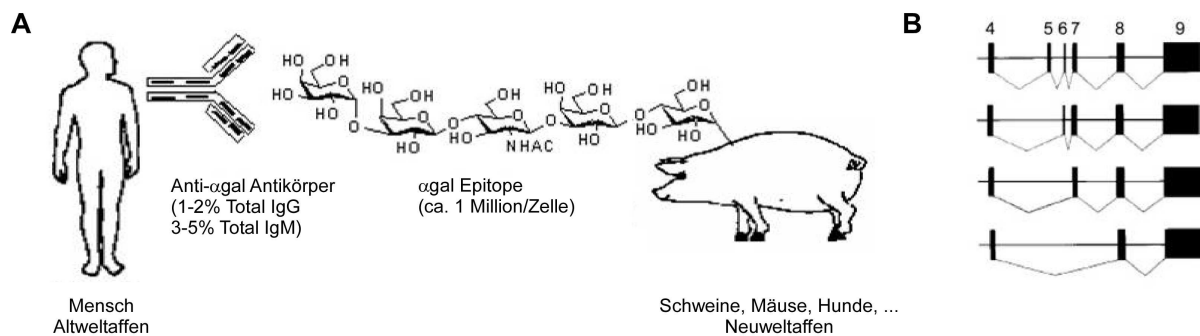
(Choi *et al* 2011). Klymiuk *et al* ist es gelungen, die Abstoßung transplantierte transgener humaner Pankreas-Zellen zur Diabetis-Therapie in humanisierten Mäusen zu verhindern (Klymiuk *et al* 2012). Zusätzlich wird an der Überexpression weiterer immunmodulatorischer Gene wie CTLA4-Ig (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4; Mulley *et al* 2006, Phelps *et al* 2009), PD-L1 (Receptor programmed cell death ligand 1; Keir *et al* 2007, Sharpe *et al* 2007, Plege *et al* 2010, Kempter *et al* 2012) oder TM (Thrombomodulin; Petersen *et al* 2009) zur Verzögerung der Hyperakuten Abstoßungsreaktion gearbeitet sowie an der Entwicklung von siRNAs gegen PERV (Porcine endogenous Retrovirus; Dieckhoff *et al* 2008, Mattiuzzo *et al* 2008, Ramsoondar *et al* 2009, Denner und Tönjes 2012). Die PERVs stellen bei einer Xenotransplantation ein Sicherheitsrisiko hinsichtlich einer möglichen Übertragung retroviraler Sequenzen dar, wenn sie durch das menschliche Immunsystem nicht erkannt werden.

Trotz dieser ersten Erfolge wird noch viel Forschungsarbeit nötig sein, um alle nötigen Transgene und siRNAs zu kombinieren und stabile multitransgene Schweine für erfolgreiche und langfristige Xenotransplantation zu generieren (Ekser *et al* 2009).

### 1.5. $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase

Menschen und Altweltaffen besitzen natürlich vorkommende Antikörper gegen Galaktosyl- $\alpha$ -1,3-Galaktose Moleküle ( $\alpha$ gal Epitope), welche z.B. auf der Zelloberfläche von Schweinezellen vorkommen (Abbildung 6A). Diese Antikörper gegen  $\alpha$ gal Epitope verursachen die HAR von transplantierten artfremden Zellen, Geweben bis hin zu ganzen Organen (Cooper *et al* 1993, siehe 1.6). Das Gen *GGAT1* in Schweinen kodiert für das Enzym  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase ( $\alpha$ GT), welches für die Synthese der  $\alpha$ gal Epitope verantwortlich ist. Die  $\alpha$ GT besitzt vier Hauptpleißvarianten in denen stets das Exon 9 mit der Kodierung für die enzymatische Aktivität enthalten ist (Katayama *et al* 1998) (Abbildung 6B). Einige Forschergruppen haben bereits über den Kernransfer von somatischen Zellen mit einem Gendefekt im *GGAT1* Gen  $GGAT1^{-/-}$  Schweine generiert (Dai *et al* 2002, Lai *et al* 2002, Phelps *et al* 2003). Die Zellen dieser Tiere zeigten ein minimales Level bis hin zum völligen Fehlen (Knockout) der  $\alpha$ gal Epitope (Sharma *et al* 2003, Milland *et al* 2006). Da die Generierung eines homozygoten  $GGAT1^{-/-}$  Doppelknockout Schweines (GTKO) sehr langwierig und schwierig war, könnte die Entwicklung transgener Schweine mit Hilfe lentiviraler Vektoren und RNAi eine schnellere und kostengünstigere Alternative darstellen

(Hofmann *et al* 2003, Whitelaw *et al* 2004). Hierbei sind die vier Haupt-Splicevarianten der  $\alpha$ GT mRNA (Abbildung 6B) die Ziele der siRNA Bindung (Katayama *et al* 1998). Zhu *et al* gelang es erstmalig 2005 die  $\alpha$ GT mRNA mittels RNAi in ihrer Expression zu reduzieren (Zhu *et al* 2005, Zhu *et al* 2008).



**Abbildung 6**

**Darstellung der  $\alpha$ gal Epitope (A) sowie der Splicevarianten der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA (B).** modifiziert nach <http://www.bioscience.org/1999/v4/d/buhler/fulltext.htm>. (A) Schematische Darstellung der humanen Antikörper gegen die  $\alpha$ gal Epitope der  $\alpha$ GT. (B) Darstellung der vier Haupt-Splicevarianten der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA in Schweinezellen nach Katayama *et al*. Exon 9 enthält die enzymatische Aktivität.

## 1.6. Multitransgene Lentivirale Vektoren

Neben der Verwendung von silencing-Mechanismen gegen die  $\alpha$ gal Epitope stellt die Expression von immunmodulatorischen und Komplement regulatorischen Genen eine weitere zusätzliche Möglichkeit dar, die HAR zu verhindern und auch die verzögerte Organabstoßung von transplantierten Schweineorganen im Menschen zu minimieren, da Milland *et al* nachweisen konnte, dass in heterozygoten GTKO Schweinen noch eine minimale Anzahl von  $\alpha$ gal Epitopen vorkommt (Milland *et al* 2006).

Die Endo- $\beta$ -galactosidase C (EndoGalC) von *Clostridium perfringens*, fusioniert mit dem Golgi-Lokalisationssignal der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase, ist in der Lage,  $\alpha$ gal Epitope auf Schweinezellen zu reduzieren (Ogawa *et al* 2002, Watanabe *et al* 2008, Ashida *et al* 2001). Zu den Komplement regulatorischen Proteinen (CRPs) gehören Proteine wie CD39, CD46, CD59, DAF (decay accelerating factor, CD55) oder CR1 (Complement Receptor Type 1, CD35). Die Komplement regulatorischen Proteine bilden neben den Antikörpern einen wichtigen Bestandteil in der Regulation der Immunantwort. Die trunkierte und damit sezernierte Rezeptorvariante (tsCR1) des CR1 ohne cytoplasmatische und transmembrane

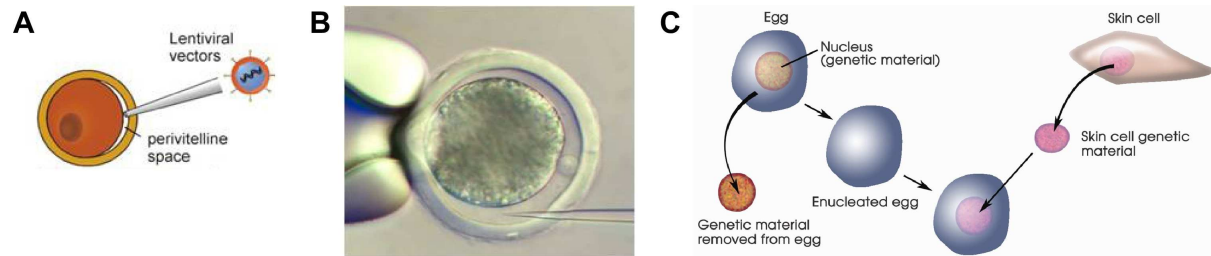
Domäne ist in der Lage, die Zelllyse von Schweinezellen durch humanes Komplement fast vollständig zu inhibieren (Manzi *et al* 2006, Chernajovsky *et al* 2000).

In lentiviralen Vektoren kann eine Kombination von Transgenkassetten zur RNAi und Überexpression erfolgen. Um viele Transgene platzsparend in einem lentiviralen Vektor zu kodieren, bietet sich beispielsweise die Verwendung von sogenannten 2A Elementen an (Donnelly *et al* 2001) wodurch ein Promoter die Transkription mehrerer Transgene regulieren kann. Die ca. 20aa langen 2A Elemente kommen natürlicherweise in Viren vor (F2A, Foot and Mouth disease virus; E2A, Equine rhinitis A virus; T2A, Thosea asigna virus) und stellen ein natürliches Spaltungssignal durch das ubiquitär exprimierte Enzym Furin (Furin cleavage Site) dar (de Felipe 2004). Viele Forschergruppen konnten unter Verwendung lentiviraler Vektoren die homogene Transgenexpression mit bis zu vier Transgenen verbunden über drei 2A Elemente nachweisen (Carey *et al* 2009, Donnelly *et al* 2001, de Felipe 2006, Fang *et al* 2005, Szymczak *et al* 2004). Chinnasamy *et al* zeigte jedoch, dass die Transgenexpression des letzten Transgenes auch geringer ausfallen kann, die Spaltungseffizienz Konstruktabhängig ist und fast 10% ungespaltene Proteine in den Zellen zu finden sind (Chinnasamy *et al* 2006). Auch können Deletionen bei großen Transgenen (de Felipe 2003) und fehlende Funktionalitäten der Transgene durch verbleibende Aminosäuren nach Spaltung der 2A Sequenz auftreten (Hasegawa *et al* 2007) was bei jedem Konstrukt und Transgen eine ausführliche Austestung *in vitro* nötig macht.

## 1.7. Generierung transgener Schweine

Transgene Tiere tragen aufgrund menschlicher Intervention rekombinante DNA in ihrem Genom (Wall 1996). Die ersten transgenen Tiere wurden von Rudolf Jaenisch und Beatrice Mintz durch DNA Mikroinjektion in Mäuseembryonen erzeugt (Jaenisch und Mintz 1974). 2002 entstanden die ersten transgenen Mäuse und Ratten durch Infektion von Präimplantationsembryonen mit lentiviralen SIN-Vektoren mit stabiler Transgenexpression und Weitergabe über die Keimbahn (Lois *et al* 2002, Pfeifer *et al* 2002). Die Entwicklung transgener Schweine mittels lentiviraler Vektoren konnte durch Hofmann *et al* und Whitelaw *et al* gezeigt werden (Hofmann *et al* 2003 und 2006, Whitelaw *et al* 2004). Die Generierung transgener Schweine erfolgte dabei über die Injektion der lentiviralen Vektoren in den perivitellinen Raum befruchteter Eizellen und anschließendem Embryonaltransfer (ET) (Abbildung 7A und 7B). Eine weitere Möglichkeit stellt der Kerntransfer (Nukleustransfer) in

entkernte Oozyten (NT) dar. Nach Infektion von Schweinefibroblasten mit den gewünschten Vektoren wird der Fibroblastenkern in eine entkernte Oozyte transferiert und die entstehenden Embryonen in das Muttertier implantiert (Aigner und Wolf 2010, Giraldo *et al* 2012) (Abbildung 7C).



**Abbildung 7**

**Subzonale Injektion und Nukleustransfer.**

(A) Schematische Darstellung der subzonalen Injektion der lentiviralen Vektoren in den perivitellinen Raum von befruchteten Eizellen und (B) entsprechende Hellfeldmikroskopie. (C) Schematische Darstellung des Nukleustransfers.

Diese Methoden könnten die Generierung transgener Schweine ermöglichen ohne größeren zeitlichen Aufwand, wie er beispielsweise bei der Generierung von Knockout-Schweinen entsteht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien und Lösungen

Wenn nicht anders angegeben wurden Chemikalien der Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Millipore (Darmstadt), Calbiochem (Darmstadt), VWR Prolabo (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München) verwendet.

Lösungen wurden stets mit bidestilliertem (EASYPure UV/UF system der Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen) und sterilisiertem Wasser angesetzt und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

### 2.2. Geräte

Folgende Großgeräte wurden zur Durchführung der Experimente verwendet:

Autoklav (Varioklav 135S, Thermo Scientific, Dreieich), Bakterienschüttler (Sartorius, Göttingen), Bakterienzentrifuge (Sigma GK15, Sartorius, Göttingen), CO<sub>2</sub> Inkubationsschrank Zellkultur (CB150, Binder, Tuttlingen; HeraCell 150, Heraeus, Hanau; Certomat IS, Sartorius, Göttingen), Durchflußcytometer Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Krefeld), Elektrobloetter für Northern Blot (NB; Peqlab, Erlangen), Elektrophorese- und Blottingkammer für Westernblot (WB; Mini-Protean 3 Cell, BioRad, München), ELISA-Plate Reader (Tecan, Crailsheim), Entwicklermaschine (Film Processor CP100, Agfa, Köln), Geldoc (UV light transilluminator Geldoc®XR, BioRad, München), Gefrierschrank -20°C (Liebherr, Biberach), Gefrierschrank -80°C (Revco Value Plus, Thermo Scientific, Dreieich), Gellaufkammer für Agarosegele (RunOne™ EmbiTec, Peqlab, Erlangen), Gellaufkammer für Agarosegele (Mupid, Biorad, München), Inkubationsschrank 37°C und 55°C (Heraeus, Hanau; Advantage Lab, Darmstadt), Kühlzentrifuge bis 13.000rpm (Biofuge Primo, Heraeus, Hanau; 5415R, Eppendorff, Hamburg, I-GK15, Sartorius, Göttingen), Laminar Air Flow (Kojair BW-200silus, Kojair, Finnland; HeraSafe, Heraeus, Hanau), Magnetrührer (Heidolph MR, Schwabach), Mikroskop (Leica MZ16F Stereomikroskop, Lichtquelle KL150DLCD; Leica DM14000B Fluoreszenz, Lichtquelle LTR4000; Kamera DFC420C; Leica, Wetzlar), Mikrowelle (Severin, Sundern), Multipipette (Eppendorf, Hamburg), PCR Gerät (Thermocycler T1, Biometra, Göttingen), Photometer (Eppendorf Biophotometer 6131,

Hamburg), Pipetten (Sarstedt, Nürnberg; Gilson, Limburg), Powersupply (Consort E835, Peqlab, Erlangen), Real-Time PCR Gerät (iQ5 Cyclex, BioRAD), Rollinkubator für NB und Southernblot (SB; Heidolph MR, Schwabach), Scintillations-Meßgerät (FCI Frenzel, Straubenhardt), Stickstofflagertank (Vorratstank Apollo 200, Probenlagersystem Biosafe100, Füllstandsregelgerät ADUR-β; Cryotherm, Kirchen/Sieg), Thermomixer (Eppendorf 5350, Hamburg), Ultraschallbad (USC100T, VWR, Darmstadt), Ultrazentrifuge + Rotoren (Optima L-100XP/L-80XP, SW32 Rotor, SW55 Rotor, Beckman Coulter, USA bzw. Krefeld), UV-Crosslinker (CL-1000 UVP, Hoefer, USA), Vortexer (Peqlab, Erlangen; VWR, Darmstadt), Wasseraufbereitungsanlage für ddH<sub>2</sub>O (EASYPure UV/UF system der Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen; Arium 611VF, Sartorius, Göttingen), Wasserbad (Haake P14, Thermo Haake, USA bzw. Karlsruhe), Wippe/Schüttler (Heidolph Dmax1000, Schwabach).

## 2.3. Design der short hairpin Oligonukleotide

### 2.3.1. Ermittlung der Sekundärstruktur

Für den optimalen siRNA Knockdown der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase wurde die Pubmed AF221508 Sequenz der *Sus Scrofa*  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA (Anhang Sequenz 6.1.1.) verwendet und die Sekundärstruktur der RNA von Exon 4-9 über <http://mfold.bioinfo.rpi.edu/> ermittelt (Zucker *et al* 2003, Mathews *et al* 2004). Die Lage der siRNAs wurde nach Möglichkeit auf einzelsträngige RNA Sekundärstrukturbereiche ausgerichtet.

### 2.3.2. siRNA Design

Die Lage der siRNAs beschränkte sich auf die Exons 4-9 der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase. Dabei wurden bei der siRNA Entwicklung folgende Kriterien herangezogen bzw. berücksichtigt: (i) Zusammensetzung der siRNA Sequenz nach Reynolds *et al* (an Position drei A/U, an Position 10 U, an Position 13 A/U/C, an Position 19 A; Reynolds *et al* 2004), (ii) siRNA-Bindungsstelle an möglichst einzelsträngige  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA Bereiche (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>; Zucker *et al* 2003), (iii) %GC Gehalt (<http://www.genelink.com/tools/gl-tm.asp>; Heale *et al* 2005), (iv) Sekundärstruktur der siRNA (antisense Strang) nach Zucker *et al* (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>; Zucker *et al* 2003, Mathews *et al* 2004) sowie (v) möglichst niedrige kcal/mol Werte (antisense Strang;

<http://saturn.coh.org:8080/calc/index.php>; Heale *et al* 2005). Die siRNA Länge betrug 19 oder 21 Basen (Reynolds *et al* 2004) mit der Ausnahme der siRNA2-27 mit 27 Basen (Kim *et al* 2005, Elbashir *et al* 2001).

### 2.3.3. shRNA Design

Alle shRNAs wurden auf Grundlage von ermittelten, erhaltenen oder publizierten siRNA-Sequenzen in der Orientierung antisense-Loop-sense-Terminationssignal (ass) gebildet. Die shRNA 12 wurde zusätzlich in der Orientierung sense-Loop-antisense-Terminationssignal (sas) kloniert und getestet. Das Terminationssignal bestand aus fünf Thyminen. Die Loopsequenz war TTCAAGAGA (Zhu *et al* 2003), bei den shRNAs 11 und 12 war die Loopsequenz CCACACC (Eigendesign). Die siRNAs 13 und 14 wurden durch die Firma B-Bridge siPRECISE (USA bzw. Heidelberg) und die siRNAs 15 und 17 durch EuroGenTech (Köln) nach deren firmeneigenen spezifischen Algorithmen hergestellt und nachfolgend eigens in der Orientierung antisense-Loop-sense-Terminationssignal als shRNA generiert. Die Sequenz der siRNA 20 stammte aus Zhu *et al* und diente als eigens gebildete shRNA20 als Positivkontrolle (Zhu *et al* 2005). Die shRNA Oligonukleotide für die Klonierung mit U6-Plasmiden wurden so entwickelt, das sie nach abgeschlossenem Annealing (2.4.1.) und Phosphorylierung (2.4.2.) der forward und reverse Oligonukleotide als shRNA-Doppelstrang am 5'Ende blunt waren und am 3' Ende eine funktionelle *Xba*I Schnittstelle aufwiesen und somit in das pTZU6+1 Shuttleplasmid (6.3.1.) ligiert werden konnten (2.5. und 2.6.). Die shRNA Oligonukleotide für die H1-shRNA Expressionskassetten wurden so entwickelt, das sie als shRNA-Doppelstrang am 5'Ende eine funktionelle *Bgl*II und am 3' Ende eine funktionelle *Hind*III Schnittstelle für die Klonierung in das Virusplasmid mit H1 Promoter aufwiesen (2.6.). Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon ([www.eurofinsdna.com/](http://www.eurofinsdna.com/), Ebersberg) synthetisiert. Alle shRNAs sind in Tabelle 15 im Anhang aufgelistet.

## 2.4. Molekularbiologische Klonierungs-Methoden

### 2.4.1. Annealing von shRNA Oligonukleotiden

Die beiden jeweils komplementären und einzelsträngigen shRNA Oligonukleotide (10pmol/μl) wurden zu gleichen Teilen gemischt, für 15min im 80°C heißen Wasserbad inkubiert und anschliessend langsam innerhalb 1h auf RT abgekühlt.

ss-shRNA Oligonukleotid 1_fw	10µl
ss-shRNA Oligonukleotid 2_rev	10µl

#### 2.4.2. Phosphorylierung von shRNA Oligonukleotiden

Allen doppelsträngigen shRNA Oligonukleotiden wurde durch Inkubation mit T4 Polynukleotid Kinase (PNK) bei 37°C für 30min ein  $\gamma$ -Phosphat von ATP an das 5'Ende angefügt:

ds-shRNA	10µl
10x Ligase Puffer	2µl
PNK	1µl
H <sub>2</sub> O	7µl

#### 2.4.3. Restriktionsverdau von DNA

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen NewEnglandBiolabs (NEB, Frankfurt a.M.), Invitrogen (bzw. life technologies, Darmstadt) und Fermentas (bzw. Thermo Scientific, Dreieich) bezogen. Die Restriktionsansätze wurden nach Angaben der Hersteller mit Puffern von NEB (Frankfurt a.M.) oder Roche (Unterhaching) durchgeführt. Für den Verdau von 1µg DNA wurde standardmäßig folgende Reaktion bei 37°C für 1h angesetzt:

DNA	1µg
10x Puffer	2µl
Enzym	5 Units
H <sub>2</sub> O	ad 20µl

Für präparative Restriktionsverdaue wurden bis zu 10µg Plasmid oder PCR-Ansatz in einem Volumen von 50µl angesetzt.

#### 2.4.4. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Zur Entfernung der reaktiven 5'-Phosphatgruppe nach Restriktionsverdau und zur Vorbereitung auf Ligationen mit den Inserts wurden alle DNA-Plasmide mit Calf Intestine



Phosphatase (CIP) nach folgendem Protokoll bei 37°C für 30min dephosphoryliert:

DNA	1µg
10x NEB3 Puffer	2µl
CIP	1µl
H <sub>2</sub> O	ad 20µl

#### 2.4.5. Auffüllen von DNA-Enden nach Restriktionsverdau

Durch Inkubation mit der T4 Polymerase bei 37°C für 30min wurden nach folgendem Protokoll durch Auffüllen der durch Restriktionsverdau gewonnenen und dephosphorylierten 5'Überhänge glatte DNA Enden generiert:

DNA	1µg
10x NEB3 Puffer	2µl
dNTPs (10mM)	2µl
T4 Polymerase	1µl
H <sub>2</sub> O	ad 20µl

#### 2.4.6. Agarose Gelelektrophorese

Zur analytischen oder präparativen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,7-3%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde Agarose in 1x TBE (Tabelle 1) unter mehrmaligem Aufkochen gelöst, die Lösung unter ständigem Rühren auf ca. 50°C abgekühlt und nach Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 800ng/ml in Gelkammern der Firmen Peqlab (Erlangen) oder Biorad (München) gegossen. Die Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (Tabelle 1) oder 10x Loading Dye (Tabelle 1) versetzt und pro Geltasche maximal 1µg DNA aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 30-60min in 1x TBE bei 100V wurden die Größen und Konzentrationen der DNA-Fragmente durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen DNA-Standards (1kb Ladder, Invitrogen, USA) bestimmt. Die DNA Banden wurden per UV Light Transilluminator GelDoc (GelDoc®XR mit QuantityOne® Software, Biorad, München) bei 366nm visualisiert.

**Tabelle 1**  
**Auflistung der Lösungen für Agarosegele und Probenauftragung.**

10x Loading Dye		6x Auftragspuffer		10x TBE	
Harnstoff	21g	10x TBE	60%	Tris-HCl	0,9M
Glycerol	20ml	Ficoll Typ 400	18%	Borsäure	0,9M
EDTA; 0,5M	5ml	EDTA; pH 8,0	0,12M	EDTA; pH 8,0	20mM
Tris-HCl; pH7,0; 1M	0,5ml	Bromphenolblau	0,15%		
Bromphenolblau	0,5mg*	Xylencyanol FF	0,15%		
Xylencyanol	0,5mg*				
Lösen durch Rühren					

Loading Dye und Auftragspuffer wurden bei 4°C gelagert, 10x TBE bei RT. \* entspricht etwa einer Spatelspitze.

#### 2.4.7. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um nach Auftrennung der DNA-Fragmente nach Agarose Gelelektrophorese (2.4.6.) die DNA aus dem Gel zu extrahieren, wurde das GFX®-Kit (GE-Health Care, UK) nach den Anleitungen des Herstellers verwendet. Die DNA wurde stets mit 35µl H<sub>2</sub>O eluiert und die Konzentration in 2µl Lösung über Gelelektrophorese durch den Vergleich mit dem DNA-Standard (2.4.6.) bestimmt.

#### 2.4.8. Ligation

Während der Ligation werden Plasmid und DNA-Fragmente bzw. ds-shRNA Fragmente miteinander verbunden. Die Plasmide wurden dafür zuvor mit Restriktionsenzymen verdaut (2.4.3.), dephosphoryliert (2.4.4.) und die Plasmidenden teilweise aufgefüllt (2.4.5.). Die T4 DNA Ligase generiert bei 16°C im Wasserbad über Nacht nach folgendem Protokoll eine Phosphodiestergruppe zwischen einer 3'Hydroxyl- und einer 5'Phosphatgruppe:

<u>Plasmid + DNA-Fragment</u>		<u>Plasmid + ds-shRNA</u>	
DNA-Fragment (2.4.7.)	150ng	ds-shRNA (2.4.2.)	7,5µl
Plasmid-DNA (Vektor)	50ng	Plasmid-DNA (Vektor)	50ng
10x Ligase Puffer	1,5µl	10x Ligase Puffer	0,75µl
T4 DNA Ligase	1µl	T4 DNA Ligase	1µl
H <sub>2</sub> O	ad 15µl	H <sub>2</sub> O	ad 15µl

#### 2.4.9. Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* XL-1 Blue

Als Standard-Bakterienstamm für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien diente der *E.coli* Stamm XL-1 Blue MRF (Stratagene, USA). Aus einem Bakterienklon eines Verdünnungsausstriches auf Agarplatten (30µg/ml Tetracyclin) (Tabelle 2) wurde über Nacht in LB<sup>+</sup>-Medium (Tabelle 2) eine Vorkultur hergestellt (37°C, 225rpm). Je 1ml Vorkultur wurde zu 200ml LB<sup>-</sup>-Medium (Tabelle 2) gegeben und bis zu einer OD<sub>600</sub> (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) von 0,3 inkubiert (37°C, 225rpm). Das durch Zentrifugation bei 4°C und 4000rpm für 5min gewonnene Bakterienpellet wurde in 25ml frisch angesetztem Puffer A (Tabelle 2) resuspendiert, für 1h auf Eis inkubiert und erneut pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 4ml frisch angesetzten Puffer B (Tabelle 2) resuspendiert, zu je 100µl aliquotiert und schockgefroren in Trockeneis-gekühltem 100%igem Ethanol. Die Langzeitlagerung chemisch kompetenter *E.coli* XL-1 Blue erfolgte bei -80°C.

**Tabelle 2**  
**Auflistung der Lösungen für Bakterienmedien und Agarplatten.**

LB <sup>-</sup> -Medium, pH 7,5		LB <sup>+</sup> -Medium, pH 7,5		Agarplatten, pH 7,5	
Pepton	10g	Pepton	10g	Pepton	10g
Hefeextrakt	5g	Hefeextrakt	5g	Hefeextrakt	5g
NaCl	5g	NaCl	5g	NaCl	5g
H <sub>2</sub> O	ad 1l	Glucose	1g	Glucose	1g
autoklavieren		H <sub>2</sub> O	ad 1l	Agar	15g
		autoklavieren		H <sub>2</sub> O	ad 1l
				autoklavieren, bei 60°C	
				Antibiotikum zugeben	
				und Platten gießen	
Puffer A		Puffer B			
KCl	100mM	CaCl <sub>2</sub>	75mM		
MnCl <sub>2</sub>	50mM	KCl	10mM		
KAc	30mM	MOPS, pH 7,0	10mM		
CaCl <sub>2</sub>	10mM	Glycerol	15%		
Glycerol	15%	sterilfiltrieren			
sterilfiltrieren					

Alle Medien und die Agarplatten wurden bei 4°C gelagert.

#### 2.4.10. Transformation in chemisch kompetente *E.coli* XL-1 Blue

Pro 100µl Aliquot chemisch kompetenter XL-1 Blue Bakterien (2.4.9.) wurde nach dem Auftauen auf Eis bis zu 7,5µl Ligationsansatz (2.4.8.) pipettiert. Nach 30min Inkubation auf Eis folgte ein Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad für 45sec und erneuter Inkubation auf Eis für 2min. Nach Zugabe von 900µl LB<sup>+</sup>-Medium (Tabelle 2) wurde die

Bakteriensuspension für 30min bei 37°C und 225rpm inkubiert und anschliessend bei 3500rpm für 5min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ca. 100µl Restvolumen resuspendiert und je nach Antibiotikaresistenz des Plasmides auf Ampicillin-haltigen (50µg/ml) oder Kanamycin-haltigen (30µg/ml) Agarplatten (Tabelle 2) ausplattiert. Bakterienklone wurden nach einer Inkubationszeit von 14-16h bei 37°C sichtbar. Für die Klonierung von besonders großen Plasmiden wurden auch XL-10 Gold Ultrakompetente Zellen nach dem Protokoll von Stratagene (USA) verwendet.

#### 2.4.11. Plasmid-DNA Minipräparation

Die Plasmid-DNA aus Bakterienklonen (2.4.10.) wurde durch alkalische Lyse nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell 2006) isoliert. Dazu wurde jeder Klon in 5ml Antibiotika-haltigem (50µg/ml Amp oder 30µg/ml Kan) LB<sup>+</sup>-Medium (Tabelle 2) über Nacht bei 37°C und 225rpm vermehrt. Nach Zentrifugation bei 3500rpm für 5min wurde das Bakterienpellet in 250µl Puffer 1 (Tabelle 3) resuspendiert. Durch Zugabe von 250µl Puffer 2 (Tabelle 3) und Inkubation für 3min wurden die Bakterien lysiert und die Reaktion mit 250µl Puffer 3 (Tabelle 3) und anschliessender Inkubation auf Eis für 15min gestoppt. Die Zentrifugation bei 13000rpm für 15min trennte alle Zellbestandteile von der im wässrigen Überstand gelösten Plasmid-DNA, welche in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 500µl Isopropanol ausgefällt wurde. Wiederholtes Zentrifugieren (13000rpm, 15min, 4°C) pelletierte die DNA und nach einem Waschschriff mit 70%igen EtOH wurde das Pellet kurz bei RT getrocknet und in 30µl H<sub>2</sub>O gelöst.

**Tabelle 3**  
**Auflistung der Lösungen für die Plasmid-DNA Minipräparation.**

MP1-Puffer		MP2-Puffer		MP3-Puffer, pH 5,5
Tris	6,06g	NaOH	8g	KaAc 294,5g
EDTA	3,72g	H <sub>2</sub> O	ad 900ml	pH 5,5 mit Eisessig einstellen
H <sub>2</sub> O	ad 1l	10%SDS	100ml	H <sub>2</sub> O ad 1l
pH 8,0 mit HCl einstellen				
RNaseA	100mg			

Alle MP-Puffer (Minipräparation) wurden bei 4°C gelagert.

#### 2.4.12. Plasmid-DNA Maxipräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde eine Maxipräparation durchgeführt. Hierzu wurde ein Bakterienklon mit korrekter Plasmid-DNA in 100ml

Antibiotika-haltigem (50µg/ml Amp oder 30µg/ml Kan) LB<sup>+</sup>-Medium (Tabelle 2) über Nacht bei 37°C und 225rpm vermehrt. Die Isolation der Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Hersteller (MACHEREY-Nagel, Düren) mittels NucleoBond<sup>®</sup> PC 500 Kit oder NucleoBond<sup>®</sup> PC 500 EF Kit für Endotoxin-freie DNA durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 280nm (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) ermittelt.

#### 2.4.13. Amplifikations PCR

Zur Amplifikation von DNA Bereichen aus Plasmiden wurde die PCR (polymerase chain reaction, Saiki *et al* 1988) angewandt. Durch Verwendung der mi-*Pfu* Polymerase (MetaBion, Martinsried) und entsprechender Primer (Tabellen 19 und 20 im Anhang) mit den gewünschten Restriktionsschnittstellen wurden DNA-Bereiche für die anschließende Klonierung in Zielvektoren nach folgendem Protokoll amplifiziert:

<u>Amplifikations-Ansatz</u>		<u>Amplifikations-PCR Programm</u>		
Plasmid-DNA	30ng	1. Denaturierung initial	95°C	120sec
Primer 1_fw (1:10)	25pmol	2. Denaturierung	95°C	30-45sec
Primer 2_rev (1:10)	25pmol	3. Annealing	Tm	30-45sec
dNTP (10mM)	4µl	4. Synthese	72°C	500bp/min
10x Puffer	5µl	5. Synthese final	72°C	120-300sec
mi- <i>Pfu</i> (2,5units/µl)	0,5µl	Wiederholung Schritt 2 bis 4 30-35x		
H <sub>2</sub> O	ad 50µl			

Die mi-*Pfu*-Polymerase wurde aufgrund der integrierten Fehlerkorrektur, dem sogenannten proof reading, bevorzugt verwendet. Die Primer (Tabelle 19 und 20 im Anhang) wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und in gereinigter Form zur Verfügung gestellt. Die optimale Annealing Temperatur der Primerpaare wurde mittels eines Oligo-Tm-Calculator Programms (<http://www.genelink.com/tools/gl-tm.asp>) berechnet.

Die so gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend mit Restriktionsenzymen (2.4.3.) behandelt, dephosphoryliert (2.4.4.), über Gelelektrophorese (2.4.6.) aufgereinigt und extrahiert (2.4.7.) und mit den entsprechenden vorbehandelten Plasmiden ligiert (2.4.8.). Auf diese Weise wurden die H1-shRNA, PGK-EndoGalC und PGK-tsCR1 Plasmide kloniert, sowie Plasmide mit zwei und drei U6-shRNA und H1-shRNA Expressionskassetten (2.5 und 2.6).

#### 2.4.14. Semiquantitative PCR

Der Nachweis der erfolgreichen Klonierung von Transgenen in Plasmide (2.4.8.), der erfolgreichen Expression von integrierten Transgenen in Zellen (2.10.3.) sowie die Generierung von Sonden (2.10.10.) erfolgte durch Verwendung der *Taq*-Polymerase (*TaqCore*<sup>®</sup>-Kit, QBiogene, Heidelberg) nach folgendem Protokoll:

<u>Ansatz</u>		<u>PCR-Programm</u>		
cDNA	2µl	1. Denaturierung initial	95°C	120sec
Primer 1_fw	25pmol	2. Denaturierung	95°C	30sec
Primer 2_rev	25pmol	3. Annealing	50-60°C	30sec
dNTP (10mM)	8µl	4. Synthese	72°C	30-60sec
10x Puffer + MgCl <sub>2</sub>	5µl	5. Synthese final	72°C	120sec
<i>Taq</i> -Polymerase (2,5units/µl)	0,5µl	Wiederholung Schritt 2 bis 4 35-40x		
H <sub>2</sub> O	ad 50µl			

Der Ansatz wurde nach Ablauf der PCR mit 6x Auftragspuffer versetzt und je nach zu erwartenden PCR Banden auf 0,7% Agarosegele (Bandengröße bis 500bp), auf 1,5% Agarosegele (Bandengröße bis 100bp) oder auf 3,0% Agarosegele bei Bandengrößen unter 100 bp aufgetragen. Die PCR Primer (Tabelle 19 und 20 im Anhang) wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die optimale Annealing Temperatur der Primerpaare wurde mittels eines Oligo-Tm-Calculator Programms (<http://www.genelink.com/tools/gl-tm.asp>) berechnet.

#### 2.4.15. Sequenzierung

Alle klonierten Promotoren, Transgene und shRNA-Sequenzen wurden zur Überprüfung der korrekten Basenabfolge durch die Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert. Dazu wurden 500ng Plasmid und 20 pmol Sequenzierprimer (Tabelle 21 im Anhang) in einem Volumen von 7µl 0,5M Tris-Puffer (pH8,5) verschickt. Sequenzvergleich und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms DNAMan.

<u>Tris-Puffer (pH8,5)</u>	
Tris	0,06g
H <sub>2</sub> O	100ml

pH8,5 mit 1N HCl einstellen

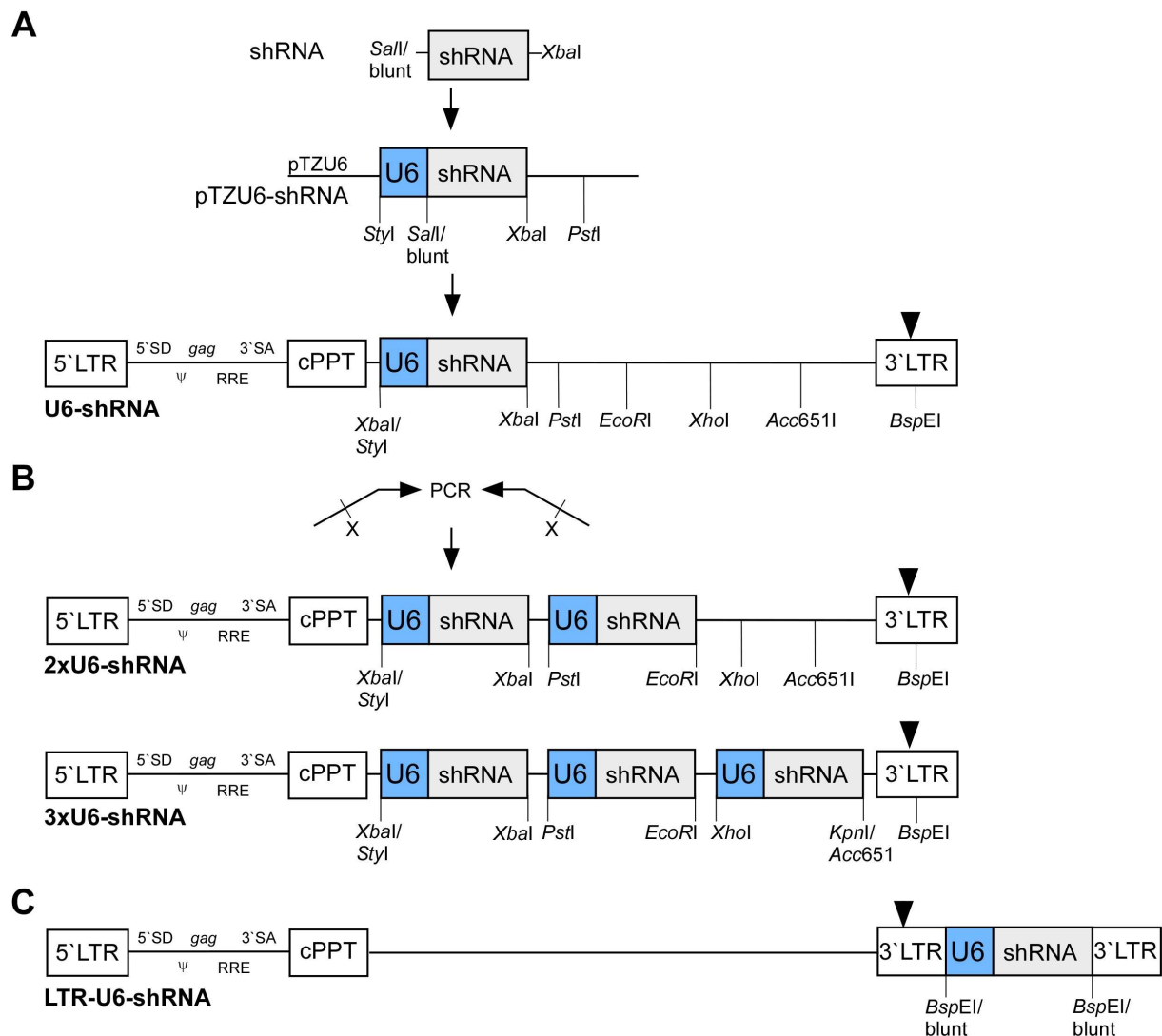
## 2.5. Shuttleplasmide und Virusplasmide

Alle ds-shRNA Oligonukleotide wurden in einem ersten Klonierungsschritt in Shuttleplasmide kloniert. Für die Generierung von U6-shRNA wurde der Shuttlevektor pTZU6+1 verwendet (small nuclear RNA U6 Pol III Promoter; Vektor von Dr. J.J. Rossi Laboratory, Beckman Research Institute, City of Hope, California; Lee *et al* 2002, Mäkinen *et al* 2006, Scherer 2004). Das Plasmid pBlueskript (pBS, Stratagene, USA) wurde als Shuttleplasmid für die Klonierung von multitransgenen Plasmiden verwendet. Die Original Virusplasmide nach dem pRRL.SIN-18 Vektorsystem wurden von Inder Verma (The Salk Institute for Biological Studies, Laboratory of Genetics, La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Der Promoter H1 (RNase P RNA H1 Promoter; Brummelkamp *et al* 2002, Lee *et al* 2002) steht im Virusplasmid Hplm-H1 zu Verfügung. Für die Austestung der Promotoren U6.3 (humaner Pol III Promoter) und 1.0-U6 (Pol III Promoter der Maus) wurden die Plasmide pRNA-U6.3/Neo (GenScript, USA) und pSilencer1.0-U6 (Ambion, Darmstadt) verwendet. Der MTD Promoter (modified tRNAm<sup>et</sup>-derived Pol II Promoter) wurde aus dem MTD-pAAV-MCS Plasmid (Stratagene, USA) in das Hplm Plasmid kloniert (Boden *et al* 2003). Die Maps der verwendeten Plasmide befinden sich im Anhang 6.3.

## 2.6. Klonierung shRNA-codierender Virusplasmide

Die shRNA Expressionskassette wurde durch Annealing (2.4.1.), Phosphorylierung (2.4.2.) und anschließender Ligation (2.4.8.) der shRNA Oligonukleotide in den pTZU6+1 Shuttleplasmid (6.3.1.) kloniert. Dafür wurde der pTZU6+1 Shuttleplasmid über einen *SalI* Restriktionsverdau (2.4.3.), anschließender DNA-Endauffüllung (2.4.5.), *XbaI* Restriktionsverdau (2.4.3.) und abschließender Plasmiddephosphorylierung (2.4.4.) vorbereitet. Die U6-shRNA Expressionskassette wurde über Restriktionsverdau mit den Enzymen *StyI/PstI* (2.4.3.) aus dem pTZU6-shRNA Vektor in das vorbereitete Virusplasmid Hplm (*XbaI/PstI*) kloniert (2.4.3. und 2.4.4.) (Abbildung 8A). Das Virusplasmid mit zwei U6-shRNA Kassetten wurde über Amplifikations-PCR (2.4.13.) der U6-shRNA mit den Primern U6-siPstI\_fw/U6-EcoRI\_rev (Tabelle 19 im Anhang) und anschließender Klonierung des Fragments hinter die erste Expressionskassette in den Hplm-U6-shRNA generiert (Abbildung 8B). Die dritte Expressionskassette wurde über Amplifikations-PCR (2.4.13.) von U6-shRNA

mit den Primern U6-siXhoI\_fw/U6-KpnI\_rev (Tabelle 19 im Anhang) und anschließender Klonierung hinter die zweite Expressionskassette in den Hplm-2x U6-shRNA (XhoI/Acc651I) eingefügt (Abbildung 8B). Das Hplm-LTR-U6-shRNA Plasmid wurde über Amplifikations-PCR (2.4.13.) von U6-shRNA mit den Primern BamHI\_fw/PstI\_rev (Tabelle 19 im Anhang), anschließend auffüllen der Enden (2.4.5.) und Klonierung (2.4.8.) in die LTR (BspEI/blunt) generiert (Abbildung 8C). Die lentiviralen Plasmide und damit generierte Lentiviren wurden im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet: U6-shRNA, 2xU6-shRNA, 3xU6-shRNA und LTR-U6-shRNA.



**Abbildung 8**

**Schematische Darstellung der Klonierung der pTZU6-shRNA Plasmide und der Generierung der U6-shRNA, 2xU6-shRNA, 3xU6-shRNA sowie LTR-U6-shRNA Plasmide über Amplifikations-PCRs der U6-shRNA Expressionskassetten und anschließender Ligation in die jeweiligen vorverdauten Virusplasmide.**

(A) Klonierung der shRNA in den pTZU6 Shuttlevektor mit anschließender Klonierung der U6-shRNA Expressionskassette in den Virusvektor Hplm. (B) Klonierung der 2xU6-shRNA, 3xU6-shRNA sowie LTR-U6-shRNA Vektoren (C) durch PCR-Amplifikation der U6-shRNA Expressionskassetten mit den jeweiligen spezifischen PCR-Primern und anschließender Ligation in die Virusplasmide. ▼ SIN Mutation.

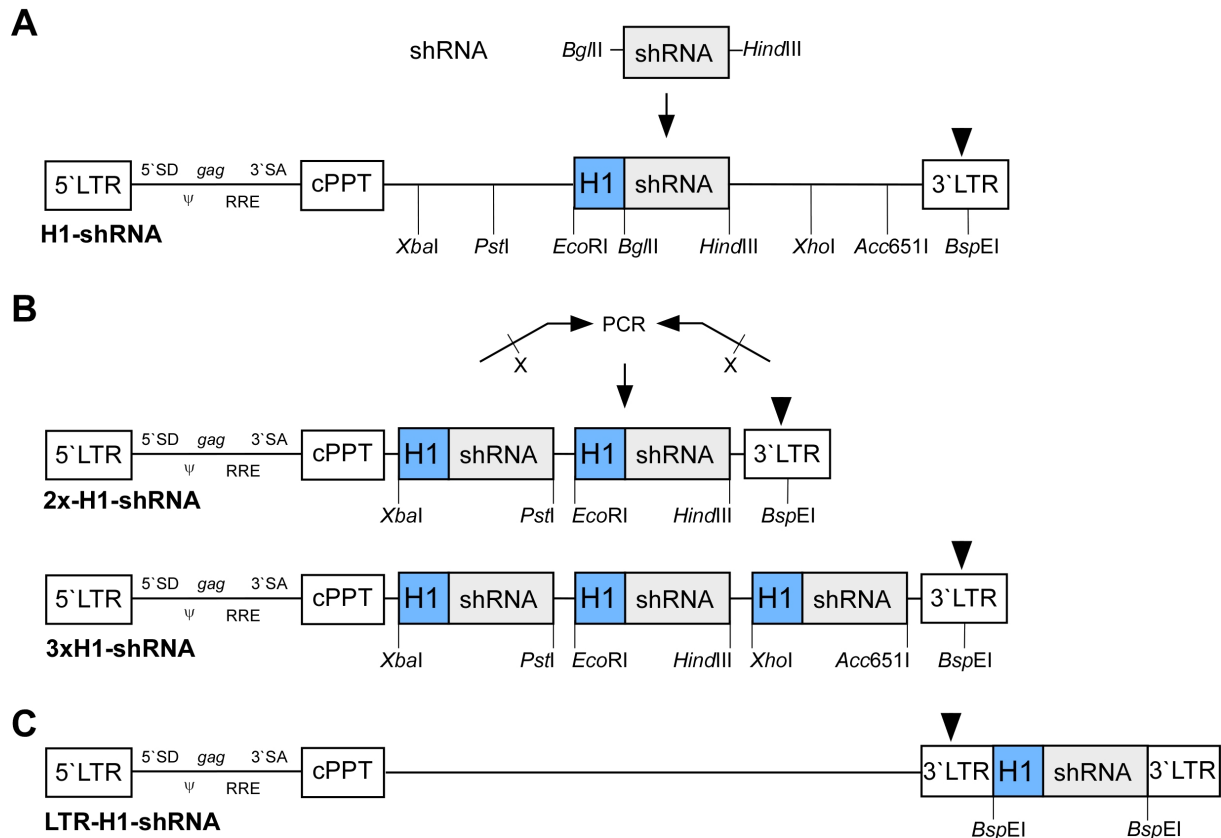


Zur Generierung von lentiviralen Konstrukten mit H1-Promoter getriebener shRNA wurden die entsprechenden shRNA Oligonukleotide mit angefügten *BglIII/HindIII* Restriktionsschnittstellen (2.4.1.), phosphoryliert (2.4.2.) und anschließend direkt in das *BglIII/HindIII* geöffneten und dephosphorylierten (2.4.3. und 2.4.4.) Hplm-H1 Virusplasmid ligiert (2.4.8. sowie Abbildung 9A). Die Hplm-2xH1-shRNA, Hplm-3xH1-shRNA und Hplm-LTR-H1-shRNA Plasmide wurden analog zu den U6-shRNA Konstrukten mit den in Tabelle 19 im Anhang aufgelisteten Primern und der in Abbildung 9B und 9C dargestellten Schemas generiert. Das Virusplasmid mit zwei H1-shRNA Kassetten wurde über Amplifikations-PCR (2.4.13.) der H1-shRNA mit den Primern H1-*siXbaI\_fw*/H1-*PstI\_rev* (Tabelle 19 im Anhang) und anschließender Klonierung des Fragments vor die erste Expressionskassette in den Hplm-H1-shRNA generiert (Abbildung 9B). Die dritte Expressionskassette wurde über Amplifikations-PCR (2.4.13.) von H1-shRNA mit den Primern H1-*siXhoI\_fw*/H1-*Acc651I\_rev* (Tabelle 19 im Anhang) und anschließender Klonierung hinter die zweite Expressionskassette in den Hplm-2x U6-shRNA (*XhoI/Acc651I*) eingefügt (Abbildung 9B). Der Hplm-LTR-U6-shRNA Vektor wurde über Amplifikations-PCR (2.4.13.) von H1-shRNA9 mit den Primern *BspEI\_fw*/*BspEI\_rev* (Tabelle 19 im Anhang) und anschließender Klonierung (2.4.8.) in die LTR (*BspEI/BspEI*) generiert (Abbildung 9C). Die lentiviralen Plasmide wurden im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet: H1-shRNA, 2xH1-shRNA, 3xH1-shRNA und LTR-H1-shRNA.

## 2.7. Klonierung multitransgener Virusplasmide

Für die Transkription der verwendeten Transgene wurde der starke und ubiquitär exprimierende PGK (Phosphoglyceratkinase) Promoter ausgewählt (Zernicka-Goetz *et al* 1997) und lentivirale Vektoren der dritten Generation mit SIN-Mustation und den in der Einleitung beschreibenden Verstärkerelementen cPPT und WPRE verwendet (Follenzi *et al* 2000, Zufferey *et al* 1999). Als Ausgangsplasmid für die Klonierung der Transgene wurde das lentivirale Plasmid Hplm-PGK-GFP-WPRE verwendet (Abbildung 10A). Dieses wurde durch Klonierung der PGK-GFP-WPRE Kassette mittels Restriktionsverdau mit *XhoI/Acc651I* aus dem lentiviralen Plasmid prrl-SIN18-PGK-GFP-WPRE (6.3.4.) generiert (Hofmann *et al* 2006).

Das Transgen EndoGalC (Manzi *et al* 2006) wurde durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und im Plasmid pBS-EndoGalC-ΔSTOP-2A zur Verfügung gestellt.

**Abbildung 9**

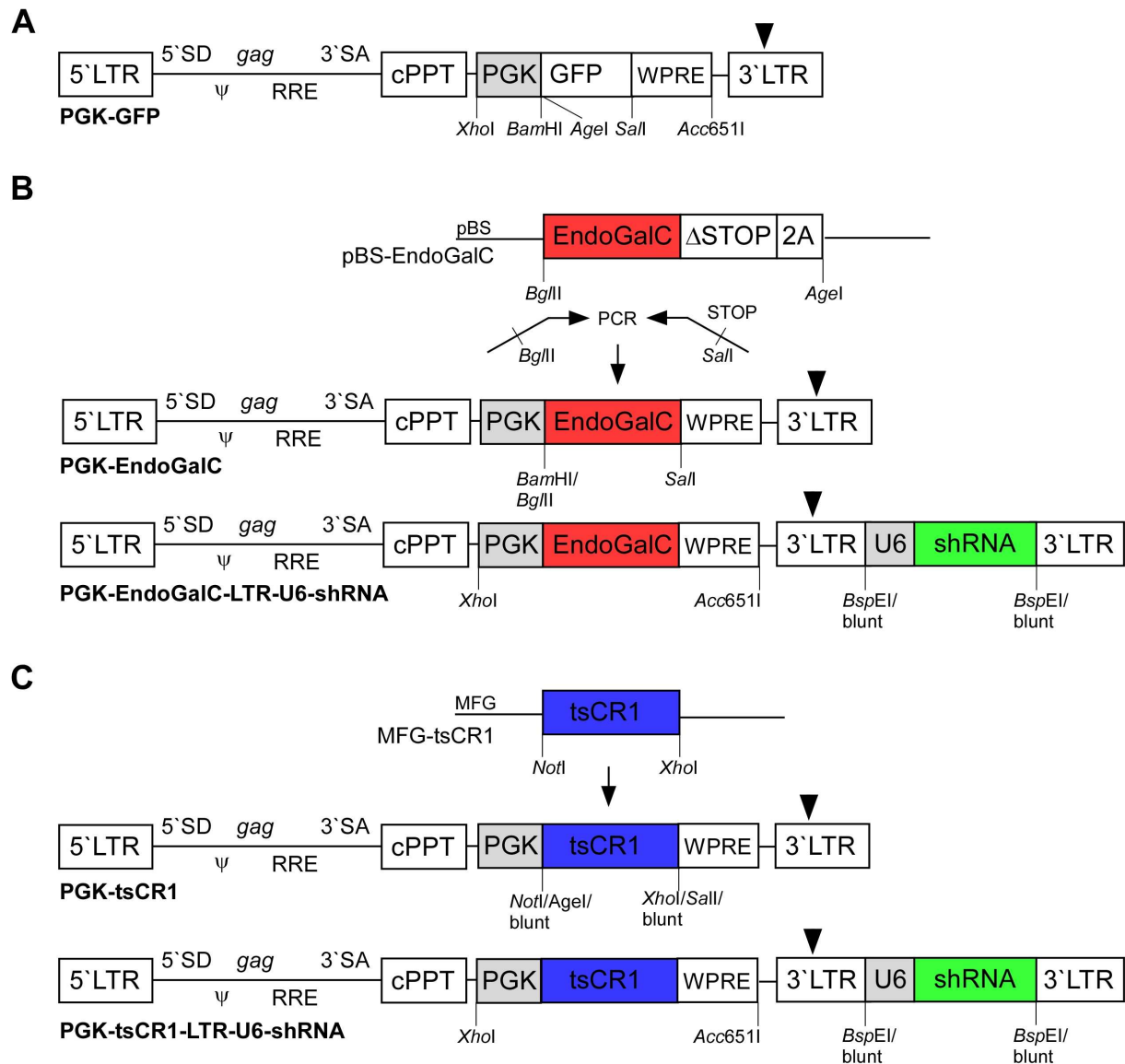
**Schematische Darstellung der Klonierung der H1-shRNA Plasmide und der Generierung der 2xH1-shRNA, 3xH1-shRNA sowie LTR-H1-shRNA Plasmide über Amplifikations-PCRs der H1-shRNA Expressionskassetten und anschließender Ligation in das jeweilige vorverdaute Virusplasmid.**

(A) Klonierung der shRNA in das Virusplasmid Hplm-H1. (B) Klonierung der 2xH1-shRNA, 3xH1-shRNA sowie LTR-H1-shRNA Plasmide (C) durch PCR-Amplifikation der H1-shRNA Expressionskassetten mit den jeweiligen spezifischen PCR-Primern und anschließender Ligation in die Virusplasmide. ▼ SIN Mutation.

EndoGalC wurde aus dem Plasmid mittels Amplifikations-PCR durch Verwendung der Primer EndoBglII\_fw/EndoStopSalI\_rev (Tabelle 19 im Anhang) generiert und in die lentiviralen Plasmide kloniert (Abbildung 10B). Die Vorbereitung des lentiviralen Plasmids Hplm-PGK-ΔGFP-WPRE erfolgte über Entfernung des Transgenes GFP mittels Restriktionsverdau (2.4.3.) mit *Bam*HI/*Sal*I und anschließender Dephosphorylierung (2.4.4.). Aus dem daraus resultierenden Hplm-PGK-EndoGalC-WPRE Plasmid wurde mittels Restriktionsverdau (2.4.3.) mit *Xho*I/*Acc*651I die PGK-EndoGalC-WPRE Kasette in ein mit *Xho*I/*Acc*651I vorverdautes und dephosphoryliertes (2.4.4.) Hplm-LTR-U6-shRNA Plasmid kloniert (Abbildung 10B).

Das Transgen tsCR1 wurde von der Arbeitsgruppe Dr. Yuti Chernajovsky (St Bartholomew's and Royal London School of Medicine and Dentistry, London, UK) im Plasmid MFG-tsCR1 zur Verfügung gestellt (Chernajovsky *et al* 2000). Das 2,3 kb große tsCR1 Fragment wurde per Restriktionsverdau (2.4.3.) mit *Not*I/*Xho*I und anschließender Auffüllung der Restriktionsenden (2.4.5.) gewonnen und in das Virusplasmid Hplm-PGK-ΔGFP-WPRE

kloniert (Abbildung 10C). Die Vorbereitung des lentiviralen Plasmids erfolgte hierbei über die Entfernung des Transgenes GFP mittels Restriktionsverdau (2.4.3.) mit *AgeI/SalI*, anschließender Auffüllung der Restriktionsenden (2.4.5.) und Dephosphorylierung (2.4.4.). Die Klonierung des Hplm-PGK-tsCR1-WPRE-LTR-U6-shRNA Plasmids (Abbildung 10C) erfolgte analog zum Hplm-PGK-EndoGalC-WPRE-LTR-U6-shRNA9 (Abbildung 10B). Im Anhang sind die Sequenzen der Transgene tsCR1 (6.1.2.) und EndoGalC (6.1.3.) sowie die Plasmidkarten (6.3.) abgebildet.

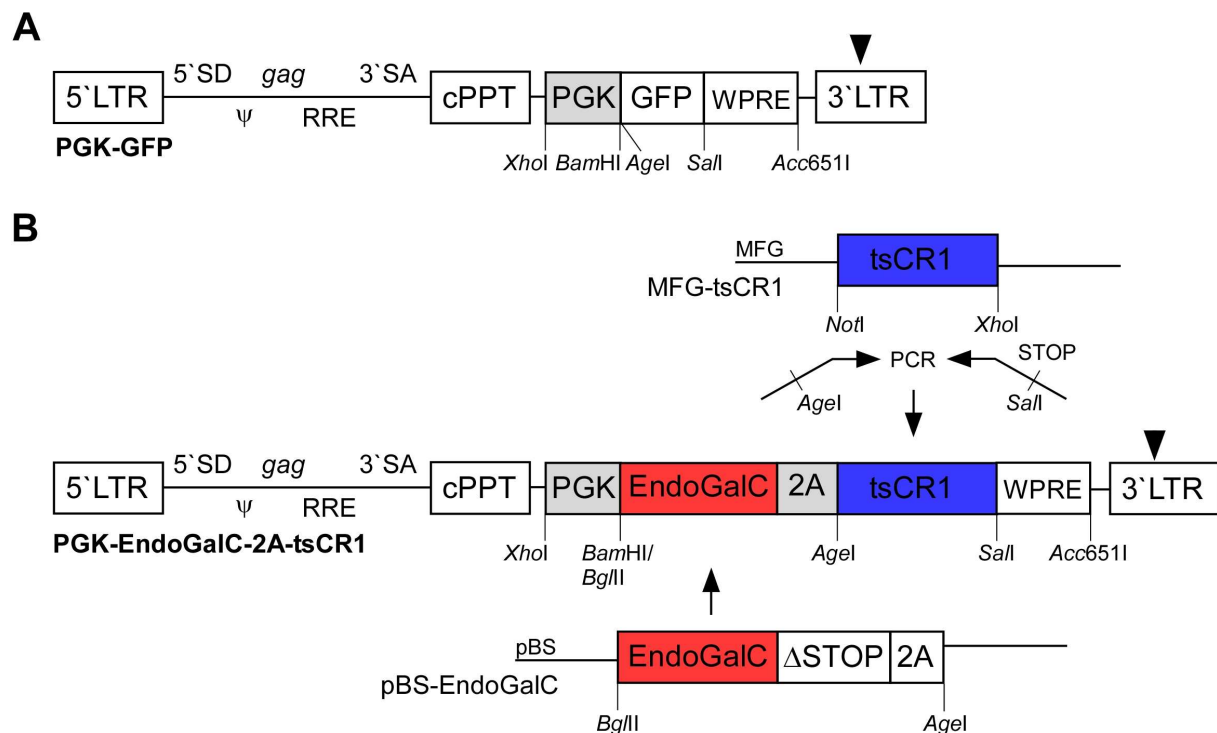


**Abbildung 10**

**Schematische Darstellung der Klonierung der Single-Transgen Virusplasmide PGK-EndoGalC und PGK-tsCR1 sowie PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA und PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA.**

(A) Ausgangsplasmid PGK-GFP mit Schnittstellen. (B) Klonierung des Transgens EndoGalC in virale Plasmide: Erzeugung von PGK-EndoGalC und PGK-EndoGalC-U6-shRNA. (C) Klonierung des Transgens tsCR1 in virale Plasmide: Erzeugung von PGK-tsCR1 und PGK-tsCR1-U6-shRNA. ▼ SIN Mutation.

Im Folgenden wurden ebenfalls multitransgene lentivirale Plasmide generiert, wobei die beiden Transgene EndoGalC und tsCR1, verbunden über das E2A Element (Donnelly *et al* 2001), in das lentivirale Plasmid Hplm-PGK-ΔGFP-WPRE kloniert wurden. Das EndoGalC-ΔSTOP-2A Element wurde über *Bgl*II/*Age*I Restriktionsverdau (2.4.3.) aus dem Shuttleplasmid pBS-EndoGalC-ΔSTOP-2A (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) gewonnen und in das lentivirale Plasmid Hplm-PGK-ΔGFP-WPRE (*Bam*HI/*Age*I) kloniert (Abbildung 11A und 11B). Das tsCR1 Fragment wurde aus dem MFG-tsCR1 (Chernajovsky *et al* 2000) Vektor über PCR (2.4.13.) unter Verwendung der Primer tsCR1-*Age*I\_fw/tsCR1-pBSStop*Sal*I\_rev (Tabelle 19 im Anhang) amplifiziert und in das Hplm-PGK-EndoGalC-ΔSTOP-2A-WPRE (*Age*I/*Sal*I) Plasmid kloniert (Abbildung 11B). Die multitransgenen lentiviralen Plasmide wurden im weiteren Verlauf wie folgt bezeichnet: PGK-EndoGalC, PGK-tsCR1, PGK-EndoGalC-2A-tsCR1, PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA sowie PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA.



**Abbildung 11**

**Schematische Darstellung der Klonierung des PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Viruskonstruktes.**

(A) Ausgangsplasmid PGK-GFP mit Schnittstellen. (B) Klonierung des Transgens EndoGalC-ΔSTOP über Restriktionsverdau und des Transgens tsCR1 über Amplifikations-PCR in das PGK-ΔGFP Virusplasmid. ▼ SIN Mutation.

## 2.8. Zellkultur

Wenn nicht anders angegeben wurden für die Zellkultivierung Einmalpipetten und Zellkulturschalen (96, 24, 6 Well, 10cm und 15cm Platten) von Sarstedt (Nürnberg) verwendet. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM 61965 (Gibco, Karlsruhe) mit 10% FBS (10% w/v, Biochrom AG, Berlin) und 1% Pen/Strep (100 U/ml Penicillin/100µg/ml Streptomycin, Biochrom AG, Berlin) (folgend nur noch als DMEM bezeichnet) in Zellkulturinkubatoren bei 10% CO<sub>2</sub> und 37°C. Wenn nötig, wurde das Medium in Abständen von 2-3 Tagen bis zum Erreichen vollständiger Konfluenz gewechselt. Alle selbst hergestellten Mediumzusätze und Lösungen wurden sterilfiltriert oder autoklaviert.

### 2.8.1. Zellen

Immortalisierte Fetale Hautfibroblasten von Ferkeln (porcine scin fibroblasts, PSF Zellen) wurden für alle Zellkulturversuche herangezogen. Die Immortalisierung erfolgte mittels lentiviraler Vektoren, welche für das large tumor antigen (TA<sub>g</sub>) des Simian Virus 40 (SV40) unter Kontrolle des PGK Promoters kodieren (Salmon *et al* 2000) (2.8.3.). Zur Kultivierung wurden die Zellen in 10cm Zellkulturschalen herangezogen. In einigen Experimenten wurden auch nicht immortalisierte PSF Zellen (fPSF#14) (2.11.) verwendet (Aigner und Wolf 2010). Für die Generierung transgener Schweine mittels NT wurden für die initiale Virustransduktion (2.9.3.) fetale fPSF#14 Zellen der AG Wolf verwendet (Aigner und Wolf 2010). Für die Herstellung lentiviraler Vektoren sowie Zellkulturversuche zur Transgenüberexpression wurden HEK293T Zellen (human embryonal kidney cells) verwendet. Als Kontrolle wurden in einigen Experimenten immortalisierte GGAT1<sup>-/-</sup> Knockout Schweinefibroblasten (igal<sup>-/-</sup>) verwendet.

### 2.8.2. Split

Die Zellen wurden mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1ml Trypsin-EDTA (Biochrom AG, Berlin) bei 10cm Zellkulturschalen und innerhalb von 5-10min bei 37°C/10% CO<sub>2</sub> abgelöst. Nach Resuspension in DMEM erfolgte der Split standardmäßig 1:8. Das Aussähen von Zellen einer bestimmten Zellzahl erfolgt durch Zellfärbung mit Trypanblau (0,4% (v/v) Lösung, Sigma Aldrich, München) und anschließender Zellzählung mittels Neubauer Zählkammer (Labomedic, Giessen).

1x PBS, pH 7,4

NaCl	8g
KCl	0,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	1,44g
H <sub>2</sub> O	ad 1l

### 2.8.3. Immortalisierung von Zellen

Fetale Hautfibroblasten aus der Oberschenkelinnenseite von frisch geborenen Ferkeln wurden in 6 Well (oder 10cm Zellkulturschalen) unter Verwendung von DMEM einige Tage bis zum Erreichen der vollständigen Konfluenz bei 10% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 10µl LV-TAg-SV40 Virus wurden die Zellen über Nacht infiziert (2.9.3.), dadurch immortalisiert und als Mischpopulation für alle Zellkulturversuche verwendet. Die so immortalisierten Zellen (PSF) wurden nach 2.8.2. weiter kultiviert und für den Großteil der Experimente verwendet.

### 2.8.4. Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden von 10cm Kulturschalen abtrypsiniert (siehe 2.8.2.), in 10ml DMEM resuspendiert und in ein 15ml Falcon (Sarstedt, Nürnberg) überführt. Nach Zentrifugation für 5min bei 1200rpm wurde das Zellpellet in 1ml Einfriermedium (DMEM + 10% (v/v) DMSO) aufgenommen und in 1,8ml Kryoröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) pipettiert. Nach 15min Inkubation auf Eis wurden die Zellen über Nacht im -80°C Gefrierschrank eingefroren und zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

### 2.8.5. Auftauen von Zellen

Das Kryoröhrchen wurde rasch aus der Stickstofflagerung in ein 37°C Wasserbad überführt und aufgetaut. Die Zellen wurden in 10ml frischem DMEM resuspendiert und in ein Falcon überführt. Nach Zentrifugation bei 1200rpm für 5min wurden die Zellen nach Entfernung des Überstandes in 10ml frischem DMEM aufgenommen und in 10cm Zellkulturschalen für die Kultivierung ausgesäht.

### 2.8.6. Transfektion von Zellen mit tsCR1 codierenden Plasmiden

Zur Austestung von kurzzeitigen Transgenüberexpressionen von tsCR1 wurden HEK293T Zellen mit tsCR1 codierenden Plasmiden transfektiert. Dazu wurden die HEK293T Zellen auf Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich, München) beschichteten 10cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Poly-L-Lysinbeschichtung erfolgte durch Zugabe von 4ml Poly-L-Lysin (Tabelle 4) in die Zellkulturschale, welches nach einer Inkubationszeit von 15min bei RT wieder entfernt wurde. 24h nach der Zellaussäung erfolgte die Kalzium-Phosphat-Transfektion bei einer Konfluenz von 40-50% nach folgendem Protokoll:

Plasmid	9µg
CaCl <sub>2</sub> (2,5M)	46,6µl
H <sub>2</sub> O	ad 466µl
2x BBS	466µl

Der 2x BBS Puffer (Tabelle 4) wurde langsam und tropfenweise zum Ansatz aus Plasmid, Wasser und CaCl<sub>2</sub> pipettiert, danach wurde die Gesamtsuspension 10x invertiert und 15min bei RT inkubiert. Der gesamte Ansatz von 932µl wurde auf die Zellen in 10ml DMEM Medium (2.8.) verteilt und bei 3% CO<sub>2</sub> und 37°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel auf 10ml FBS-freies Panserin 608 (Pan Biotech, Aidenbach) mit 1% Pen/Strep (Biochrom AG, Berlin) und weitere Kultivierung für 24h bei 10% CO<sub>2</sub>.

## 2.9. Rekombinante Lentiviren

### 2.9.1. Generierung rekombinanter Lentiviren

Die zur Produktion von selbst-inaktivierenden Lentiviren (SIN) nötigen Elemente waren auf vier separaten Plasmiden (Endotoxin-freie Maxi-Präparationen, 2.4.12.) vorhanden und wurden mittels Kalzium-Phosphat-Transfektion in HEK293T eingebracht. Die Vektorkarten sind im Anhang 6.3. aufgelistet.

Das erste Verpackungs-Plasmid pMDLg/pRRE kodiert für die gag- und pol-Proteine des Wildtyp-HIV sowie für das Polyadenylierungssignal des humanen  $\beta$ -Globins unter Kontrolle des CMV-Promoters. RSV-Rev kodiert für Rev, ohne dessen Bindung an RRE (rev responsive element) der Transport der viralen mRNA aus dem Zellkern nicht möglich wäre. Das dritte Verpackungs-Plasmid pMD.G kodiert für das Hüllprotein VSV-G unter Kontrolle

des CMV-Promoters, durch welches das Virus für die Infektion vieler Zelltypen pseudotypisiert werden kann (Dull *et al* 1998). Beim vierten Plasmid handelt es sich um das jeweils klonierte lentivirale Plasmid, welches die shRNA- oder Transgensequenzen (2.6 und 2.7) sowie das virale RNA-Verpackungssignal, cPPT und WPRE enthält.

Für die Transfektion mit dem lentiviralen Plasmid und den Struktur- und Verpackungsplasmiden wurden HEK293T Zellen auf Poly-L-Lysin beschichteten 15cm Zellkulturschalen ausgesät (Vorbehandlung mit 8ml Poly-L-Lysin; analog zu 2.8.6.) und nach 24h bei einer Konfluenz von 40-50% erfolgte die Kalzium-Phosphat-Transfektion nach folgendem Protokoll (Pfeifer und Hofmann 2009):

#### Ansatz pro 15cm Zellkulturschale

Virusplasmid	22,5µg
pMDLg/pRRE	14,6µg
RSV-Rev	5,7µg
pMD.G	7,9µg
CaCl <sub>2</sub> (2,5M)	117µl
H <sub>2</sub> O	ad 1,17ml
2x BBS	1,17ml

Der 2x BBS Puffer (Tabelle 4) wurde dabei langsam und tropfenweise zum Plasmid-CaCl<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O-Ansatz pipettiert, danach wurde die Gesamtsuspension 10x invertiert und 15min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde danach auf Zellen in 15cm Zellkulturschalen in 18ml DMEM pro Platte verteilt und die Zellen bei 3% CO<sub>2</sub> und 37°C über Nacht inkubiert. Nach 16h erfolgte ein Mediumwechsel mit 16ml DMEM und weitere Kultivierung bei 10% CO<sub>2</sub>. Die Virusernte aus dem Zellüberstand erfolgte in zwei Schritten: 24h nach dem Mediumwechsel wurde der erste virushaltige Überstand abgenommen, durch einen 45µm CA-Filter (VWR, Darmstadt) filtriert und bei 19400rpm (SW32 Rotor) und 17°C für 2h in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das erste Viruspellet wurde in HBSS (Gibco, Karlsruhe) gelöst und bei 4°C gelagert. Das zweite Viruspellet wurde nach weiteren 24h durch Zentrifugation bei 19400rpm (SW32 Rotor) und 17°C für 1,5h gewonnen, nach HBSS-Zugabe mit dem ersten resuspendierten Pellet (ca. 500µl Gesamtvolumen) vereint und über einen 2ml 20%igen Sukrosegradienten (Tabelle 4) bei 21000rpm (SW55 Rotor) und 17°C für 2h gereinigt und aufkonzentriert. Das entstandene Viruspellet wurde in 10µl HBSS pro 15cm Platte gelöst, bei 1400rpm und 16°C für 45min im Thermomixer geschüttelt und in 5-10µl Aliquots bei -80°C



gelagert. Für eine standardmäßige Viruspräparation wurden 6-12 15cm Zellkulturschalen verwendet und die Viruspellets aller Überstände vereint.

**Tabelle 4**

**Puffer für die Kalzium-Phosphat-Transfektion, Poly-L-Lysin-Plattenbeschichtung und Virusaufkonzentrierung**

2x BBS, pH 6,95		20% Sucrose (w/v)		Poly-L-Lysin	
BES	4,26g	Saccharose	20g	Poly-L-Lysin (0,01%)	50ml
NaCl	6,54g	1x PBS	ad 100ml	1x PBS	ad 500ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,085g	Sterilfiltrieren			
H <sub>2</sub> O	ad 400ml				

Alle Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

### 2.9.2. Bestimmung des Virustiters/ELISA

Der Virustiter wurde über die Menge an Reverser Transkriptase in 1µl Viruslösung mittels dem Enzyme-linked-immunosorbent Assay (ELISA, Roche) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des TECAN-Plate Readers bei 405nm und Vergleich mit der Kalibrierkurve. Die Angabe der Viruskonzentration erfolgte in ng/µl Reverser Transkriptase (*RT* bzw. *Virus-RT*).

### 2.9.3. Transduktion mit Virus

Zur Infektion von Zellen wurden am Morgen 230.000 Zellen pro Well einer 6 Well Platte ausgesäht. Nach Anwachsen der Zellen bis zum Abend wurden die Zellen standardmäßig mit DMEM mit 200ng oder 600ng *Virus-RT* über Nacht bei 10% CO<sub>2</sub> und 37°C transduziert. Dazu wurde die jeweils notwendigen Virusaliquots von -80°C auf Eis aufgetaut, kurz bei 13000rpm zentrifugiert, in einem Volumen von 800µl DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 14-16h Inkubation wurde das Mediumvolumen mit 2ml frischem DMEM aufgefüllt und die Zellen bis zum Zeitpunkt der Analyse 72h p.i. kultiviert.

## 2.10. Molekularbiologische Analyse-Methoden

### 2.10.1. Generierung von Zellklonen

Immortalisierte Porcine Schweinefibroblasten (PSF Zellen, 2.8.3.) wurden mit einer Zellzahl von ca. 100.000 Zellen pro 6 Well einer 6 Well Platte ausgesät und nach 24h mit 25ng, 50ng, 200ng oder 600ng U6-shRNA9 Virus-RT infiziert.

Nach zwei Tagen erfolgte eine Überführung der Zellen in 15cm Platten in einer Verdünnung von 1:20. Pro 6 Well wurden so ca. 10-20 15cm Platten generiert. Die vereinzelt heranwachsenden Zellklone wurden bis zur Sichtbarkeit kultiviert, das Medium wurde dabei alle zwei Tage gewechselt. Auf der Zellkulturschalenunterseite wurde mittels Hellfeldmikroskopie die Lage von 5-7 Zellklonen pro 15cm Zellkulturschale markiert. Die Zellen wurden gewaschen und die Zellklone mittels eines Fettmarkerstiftes umrandet und mit einem 30µl Trypsintropfen für 10min bei 37°C abgelöst. Die Zellklone wurden jeweils einzeln in ein Well einer 24 Well Platte überführt, kultiviert und über 6 Wells bis hin zu 10cm Zellkulturschalen herangezogen. Diese Methode dauerte insgesamt je nach Zellklon 4-6 Wochen.

### 2.10.2. RNA-Isolation

Für die RNA Isolation aus transfektierten (2.8.6.) oder transduzierten (2.9.3.) Zellen oder Gewebeproben (2.12.1.) wurde PeqGold®-TriFast (Peqlab, Erlangen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde über Nacht bei 55°C in 30-50µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst.

Die RNA Isolation für den Northern Blot (siehe 2.10.11.) wurde mittels des Protokolls des mirVana miRNA detection Kit (Ambion bzw. life technologies, Darmstadt) zur Isolation von kleinen RNA Fragmenten durchgeführt. Das RNA Pellet wurde dabei ebenfalls in 30-50µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die RNA-Konzentration wurde über photometrische Vermessung bei 260nm ermittelt.

#### DEPC-H<sub>2</sub>O

H<sub>2</sub>O            1l

DEPC           1ml

60min bei RT mischen, autoklavieren

### 2.10.3. cDNA-Synthese

Die einzelsträngige RNA (2.10.2.) wurde bei Bedarf in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Hierzu wurden 3µg RNA mittels des SuperScript®II First-Strand Synthesis Kit (Invitrogen, bzw. life technologies, Darmstadt) in cDNA nach folgendem Protokoll umgeschrieben:

<u>Ansatz cDNA-Synthese</u>		<u>PCR-Protokoll cDNA-Synthese</u>	
RNA	3µg	1. 30min	37°C
10x <i>RT</i> -Puffer	2µl	2. 5min	75°C, + 1µl Oligo-(d)T Primer
DTT	2µl	3. 10min	70°C, + 1µl DTT, + 1µl dNTP
DNaseI	0,1µl	4. 5min	42°C, + 0,25µl SuperScript®II <i>RT</i>
RNaseOUT	0,25µl	5. 50min	42°C
H <sub>2</sub> O	ad 15,25µl	6. 5min	90°C
		7. 10min	4°C, + 0,4µl RNaseH
		8. 20min	37°C

Die cDNA wurde als 2µl Aliquots bei -20°C gelagert.

### 2.10.4. Real-Time PCR

Zur Quantifizierung der mRNA Expressionslevel wurden spezielle Primer und *TaqMan*-Sonden verwendet (Eurofins MWG Operon, Ebersberg). Die Primer (Tabelle 20 im Anhang) binden dabei spezifisch an die cDNA (2.10.3.) des zu analysierenden Genes. Die *TaqMan*-Sonden trugen alle am 3'Ende einen BHQ1 (Black Hole Quencher 1) und am 5'Ende verschiedene Farbmarkierungen: Für die Analyse der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase auf mRNA Level wurde der Farbstoff FAM (*galTaq* Sonde) verwendet, für die Analyse der mRNA Level des Transgens EndoGalC der Farbstoff HEX (*EndoTaq* Sonde) und für tsCR1 der Farbstoff Cy5 (*tsCR1Taq* Sonde) verwendet (Tabelle 20 im Anhang). Zur Quantifizierung wurde der mRNA Gehalt von Actin herangezogen, indem die entsprechenden Primer sowie Sonde mit 3'BHQ1 und 5'Farbstoffmarkierung TexasRed (*actinTaq* Sonde) verwendet wurde (Tabelle 20 im Anhang). Sonden und Primer des jeweiligen Transgens sowie von Actin wurden gleichzeitig zur analysierenden cDNA gegeben. Durch die verschiedenen Farbstoffmarkierungen ist eine gleichzeitige Detektion der ct-Werte möglich. Die Real-Time PCR wurde unter Zugabe des IQ Multiplex Powermix der Firma Biorad (München) nach

folgendem Protokoll (am Beispiel von zwei gleichzeitig eingesetzten Sonden, x steht für ein beliebiges Gen, siehe Anhang Tabelle 20) durchgeführt:

pro Proben-Ansatz

cDNA            2µl  
H<sub>2</sub>O            ad 6,6µl

Jeder Ansatz mit cDNA wurde als Triplet hergestellt.

Mastermix pro Ansatz

actin <i>Taq_fw</i> 1:20	1,5µl (= 7,5pmol)
actin <i>Taq_rev</i> 1:20	1,5µl (= 7,5pmol)
actin_ <i>TaqSonde</i> 1:20	1µl (= 5pmol)
x <i>Taq_fw</i> 1:20	1,5µl (= 7,5pmol)
x <i>Taq_rev</i> 1:20	1,5µl (= 7,5pmol)
x_ <i>Sonde</i> 1:20	1µl (= 5pmol)
IQ5 Mastermix	12,5µl
H <sub>2</sub> O	ad 23µl

Jeder Ansatz mit Mastermix wurde als Triplet hergestellt. Nach dem Ansetzen der Mastermix Triplets wurde der cDNA Triplet-Ansatz hinzupipettiert, vermischt, anschließend auf drei Wells einer Multi 0,2ml Rigid PCR Ultra-well-Platte pipettiert und mit 8-strip clear flat caps (Peske, Karlsruhe) verschlossen.

Real-Time PCR Programm

1. Denaturierung	95°C	180sec	
2. Denaturierung	95°C	15sec	
3. Annealing	50°C	30sec	
4. Synthese	72°C	30sec	Real-Time Aufnahme
5. Endsynthese	72°C	180sec	
6. Schmelzkurvenermittlung	55°C	30sec	Real-Time Aufnahme

Schritte 2 bis 4 wurden 30x wiederholt. Schritt 6 wurde 81x wiederholt.

Die Auswertung erfolgte durch die Auswertungssoftware des verwendeten iCycler/Q5<sup>®</sup> Real-Time PCR Gerätes von Biorad (München). Das Gerät konnte bis zu fünf Fluorophore gleichzeitig messen. Die Primer und Sonden sind in Tabelle 20 im Anhang aufgelistet.

#### 2.10.5. SYBR-Green PCR

Neben der Real-Time PCR (2.10.4.) wurde zur Quantifizierung der mRNA Expressionslevel auch die SYBR-Green PCR verwendet. Hierbei wurden während der PCR mithilfe spezifischer Primer (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und einem Reaktionsmix, welcher das Fluorophor SYBR enthielt, SYBR-Green gelabelte PCR-Fragmente gebildet, die detektiert werden können. Die SYBR-Green PCR wurde mittels iQ SYBR Green Supermix Kit der Firma Biorad (München) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

##### pro Proben-Ansatz

cDNA	2µl
H <sub>2</sub> O	ad 6,6µl

Jeder Ansatz mit cDNA wurde als Triplet hergestellt.

##### Mastermix pro Primerpaar

x_fw 1:20	1,5µl (= 7,5pmol)
x_rev 1:20	1,5µl (= 7,5pmol)
iQ SYBR-Green Supermix	12,5µl (enthält Fluorophor SYBR)
H <sub>2</sub> O	ad 23µl

Jeder Ansatz mit Mastermix wurde als Triplet hergestellt. Nach dem Ansetzen der Mastermix Triplets wurde der cDNA Triplet-Ansatz hinzupipettiert, vermischt, anschließend auf drei Wells einer Multi 0,2ml Rigid PCR Ultra-well-Platte pipettiert und mit 8-strip clear flat caps (Peske, Karlsruhe) verschlossen.

PCR Programm

1. Denaturierung	95°C	180sec	
2. Denaturierung	95°C	15sec	
3. Annealing	50°C	30sec	
4. Synthese	72°C	30sec	Real-Time Aufnahme
5. Endsynthese	72°C	180sec	
6. Schmelzkurvenermittlung	55°C	30sec	Real-Time Aufnahme

Schritte 2 bis 4 wurden 30x wiederholt. Schritt 6 wurde 81x wiederholt.

Die Auswertung erfolgte durch die Auswertungssoftware des verwendeten iCycler/Q5<sup>®</sup> Real-Time PCR Gerätes von Biorad (Ebersberg). Die Primer sind in Tabelle 20 im Anhang aufgelistet.

#### 2.10.6. tsCR1 Proteinisolation

tsCR1 wurde aus dem Mediumüberstand und dem Zellysate von transfektierten HEK-Zellen gewonnen (2.8.6.). Hierfür wurde der Mediumüberstand abgenommen und über einen 0,2µm Filter (VWR, Darmstadt) filtriert. Das Filtrat wurde auf eine VivaSpin 15R Säule (30.000 MWCO, Sartorius, Göttingen) geladen und bei RT mit 3000g für 15min zentrifugiert. Die gewonnenen Proteine aus dem Mediumüberstand wurden so auf ein Volumen von 50-100µl aufkonzentriert. Die Proteinlösung wurde mit 1x Tx-Lyse-Puffer/Complete (Roche, Mannheim) (Tabelle 5) auf 200µl aufgefüllt und nach Bradford vermessen (2.10.7.).

Für die Bestimmung von in den Zellen verbliebenem tsCR1 wurden die HEK Zellen mit 2ml Trypsin für 5min bei 37°C inkubiert und mit 8ml Medium abgelöst (2.8.2.). Nach Zentrifugation für 5min bei 1100rpm wurde das Zellpellet mit 5ml 1x PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das Zellpellet wurde in 200µl 1x Tx-Lyse-Puffer/Complete (Tabelle 5) gelöst, für 10min auf Eis inkubiert und für 15min bei 13.000rpm zentrifugiert. Der 200µl Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (2.10.7.). Die Proteine aus Zellysate und Mediumüberstand wurden bei 4°C gelagert.

**Tabelle 5**  
**Auflistung der Lösungen für die Proteinisolation.**

3x Tx-Lyse Puffer		Complete	1x Tx-Lyse-Puffer/Complete	
Tris-HCl	50mM	1 Tablette in 2ml H <sub>2</sub> O lösen zu 500µl aliquotieren	3x Tx-Lyse-Puffer	10ml
NaCl	150mM		1x PBS	20ml
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2mM		Complete	1,2ml
Triton-X 100	0,50%			
steril filtrieren				

Alle Lösungen wurden kurzzeitig bei 4°C gelagert.

### 2.10.7. Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Zu 100µl einer 0,15M NaCl Lösung wurden 2µl der Proteinlösung (2.10.6.) gegeben und mit 1ml Coomassie (Merck, Gilching) vermischt. Nach 2min wurde die Lösung im Biophotometer bei 595 nm vermessen.

#### Coomassie-Lösung

Coomassie Brilliant Blue G 250	100mg
EtOH 95% (v/v)	50ml
Ortho-Phosphorsäure	100ml
H <sub>2</sub> O	ad 1l
durch Rühren lösen, filtrieren, bei 4°C dunkel lagern	

### 2.10.8. Isolation genomischer DNA

Zellpellets von transduzierten Zellen (2.9.3.) bzw. zerkleinerte Gewebestücke (2.12.1.) wurden mit 500µl Proteinase K-Puffer und 3,3µl Proteinase K (Roche, Unterhaching) bei 800rpm und 55°C im Thermomixer über Nacht inkubiert. Nach Zugabe von 500µl Roti®-Phenol (Roth, Karlsruhe) wurde die Probe kräftig geschüttelt, bei RT und 13.200rpm für 15min zentrifugiert und der wässrige Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 500µl Chloroform, kräftigem Schütteln und anschließender Zentrifugation wurde aus dem überführtem Überstand durch Zugabe von 800µl Isopropanol die genomische DNA (gDNA) durch vorsichtiges 12-maliges Invertieren ausgefällt. Die gDNA wurde bei RT und 13.200rpm für 10min pelletiert, für 30min bei 37°C getrocknet und über Nacht bei 55°C in ca. 100µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Proteinase K Puffer

1M Tris, pH 8,5	50ml
0,5M EDTA, pH 8,0	5ml
10% SDS (w/v)	10ml
5M NaCl	20ml
H <sub>2</sub> O	ad 500ml

## 2.10.9. Präparativer Restriktionsverdau genomischer DNA

Für die Virusintegrantenbestimmung wurden ca. 20-40µl der gDNA (2.10.8.) mit 3-6µl *Bam*HI (10U/µl) in einem Volumen von 50µl bei 37°C über Nacht geschnitten. Für die Bestimmung der Methylierung der gDNA wurden ca. 20-40µl der gDNA mit 3-6µl *Sst*I (10U/µl) und in einem zweiten Ansatz ca. 20-40µl der gDNA mit 3-6µl *Sst*I sowie 3-6µl *Eag*I oder *Cla*I (je 10U/µl) bei 37°C über Nacht geschnitten. *Eag*I bzw. *Cla*I sind methylierungssensitive Restriktionsenzyme, d.h. bei vorliegender Methylierung der gDNA an der Schnittstelle erfolgt keine DNA Restriktion.

## 2.10.10. Southern Blot

Die verdaute gDNA (2.10.9.) wurde mit 5µl 6x Auftragspuffer (Tabelle 1) versetzt und der gesamte Ansatz auf ein 0,7%iges (w/v) Agarosegel (2.4.6.) in einer Gellaufkammer (PerfectBlue, Peqlab, Erlangen) in die gespülten Geltaschen eingefüllt. Als Marker dienten 30µl 1kb Ladder Marker (Invitrogen bzw. life technologies, Darmstadt). Der Gellauf in 1x TBE Puffer (Tabelle 1) erfolgte für 30min bei 120V und anschließend für 3h (*Bam*HI cuts) oder 6h (*Sst*I/*Eag*I bzw. *Sst*I/*Cla*I cuts) bei 150V (2.10.9.). Das Gel wurde im Geldoc fotografiert und überschüssige Gelränder abgeschnitten, für 10min in 0,2M HCl, für 30min in 0,5M NaOH/1,5M NaCl und abschließend für 30min in 0,5M Tris/3M NaCl (Tabelle 6) auf dem Schüttler inkubiert.

Der Naßblot wurde anschließend in folgender Reihenfolge aufgebaut: in einer Metallwanne wurde ein Schwamm mit 10x SSC (Tabelle 6) getränkt, ein zugeschnittenes Whatmanpapier aufgelegt und das Gel platziert. Die Nylon Blotting Membran (Porengröße 0,45µm, Peqlab, Erlangen) wurde 15min in 10x SSC vorequilibriumiert, auf das Gel gelegt und mit einem zweiten Whatmanpapier luftblasenfrei abgedeckt. Eine ca. 10cm dicke Schicht aus saugfähigen Papiertüchern bewirkte über Nacht einen Flüssigkeitssog, welcher die DNA Fragmente aus



dem Gel auf die Membran blottet. Nach dem Blottvorgang wurde die Membran gewendet (DNA „nach oben“) auf ein Whatman Papier gelegt, für 5min bei RT getrocknet und für 30sec im UV-Crosslinker behandelt und somit die DNA auf der Membran fixiert. Die Membran wurde für mind. 2-3h im Rollinkubator bei 60°C in 40ml Church Buffer (Tabelle 6) vorhybridisiert und anschließend über Nacht im Rollinkubator bei 60°C in 15ml Church Buffer inklusive 1ml gelabelter Sonde hybridisiert. Die Southern Blot Sonden für die oben beschriebene Hybridisierung wurden über PCR nach dem Protokoll der Semiquantitativen PCR (2.4.14.) mit den Primern U6-9\_fw/U6-9\_rev für die U6-shRNA9 Sonde und Gag\_for/Gag\_rev für die gag-Sonde (siehe Tabelle 19 im Anhang) generiert. 100ng Sonden DNA (2.4.6.), gelöst in 7µl H<sub>2</sub>O, wurden für 10min bei 97°C denaturiert, anschließend 10min auf Eis inkubiert und nach dem Sondenherstellungsprotokoll für 50min bei 37°C inkubiert. Hierfür wurde das Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Unterhaching) für α<sup>32</sup>P-dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml Lead; GE Healthcare bzw. Perkin Elmer, Rodgau) gelabelte Sonden verwendet:

#### Sondenherstellung

100ng PCR-Sonde	7µl
α <sup>32</sup> P-dCTP	7µl
dNTP-Mix ΔdCTP	3µl
Hexanukleotide	1,5µl
Klenow-Polymerase	1µl

Zur Aufreinigung wurde eine Sephadex Säule (GE-Healthcare, England) senkrecht in ein Stativ eingespannt, mit 3ml 1x TE Puffer (Tabelle 6) gespült und der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben. Die erste Fraktion, welche durch Zugabe von 380µl 1x TE durchläuft, kann verworfen werden. Durch Zugabe von 400µl 1x TE wurden anschließend die radioaktiv markierten DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Radioaktivität (gemessen in cpm mittels Szintillationszähler) von ca. 1-4x 10<sup>7</sup>cpm/400µl erhalten. Die gelabelte Sonde wird im letzten Schritt mit 600µl 1x TE Puffer in einem 15ml Rundbodenfalcon (Nalgene bzw. Thermo Scientific, Dreieich) für 10min in kochendem Wasser denaturiert.

Die Membran wurde nach abgeschlossener Hybridisierung für 15min in 2x SSC/0,1% (w/v) SDS bei 60°C, für 30min in 0,4x SSC/0,1% (w/v) SDS bei 65°C und für mind. 40min in 0,4x SSC/0,1% (w/v) SDS (Tabelle 6) bei 68°C gewaschen. Auf die Membran, eingebettet zwischen zwei Folien, wurde der Entwicklerfilm Hyperfilm MP (Amersham bzw. GE

Healthcare, England) für mind. 4 Tage aufgelegt und in einer Entwicklerkassette dunkel bei -80°C gelagert. Zur Signalverstärkung wurden die Verstärkerfolien Standard 100 oder Extra 200 (Amersham bzw. GE Healthcare, England) verwendet. Die Filmentwicklung erfolgte mittels der CP100 Entwicklerrmaschine (Agfa, München).

**Tabelle 6**  
**Auflistung aller Southern Blot Lösungen**

<b>3M NaCl</b>		<b>1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>		<b>1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	
NaCl	175,32g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	355,98g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	69g
H <sub>2</sub> O	ad 1l	H <sub>2</sub> O	ad 2l	H <sub>2</sub> O	ad 500ml
<b>0,2N HCl</b>		<b>1M NaOH</b>		<b>0,5M NaOH/1,5M NaCl</b>	
37%ige HCl	10ml	NaOH	20g	NaOH	10g
H <sub>2</sub> O	ad 500ml	H <sub>2</sub> O	ad 500ml	NaCl	43,75g
frisch herstellen		frisch herstellen		H <sub>2</sub> O	ad 500ml
<b>20x SSC</b>		<b>20% (w/v) SDS</b>		<b>TE-Puffer</b>	
NaCl	350,6g	SDS	200g	1M Tris, pH 8,0	10ml
Na <sub>3</sub> -Citrat*2H <sub>2</sub> O	176,4g	H <sub>2</sub> O	ad 1l	0,5M EDTA, pH8,0	2ml
H <sub>2</sub> O	ad 2l	3h unter Rühren lösen		H <sub>2</sub> O	ad 1l
<b>2x SSC/0,1% SDS</b>		<b>0,4x SSC/0,1% SDS</b>		<b>0,5M EDTA, pH8,0</b>	
20x SSC	100ml	20x SSC	20ml	EDTA	93,06g
20% (w/v) SDS	5ml	20% (w/v) SDS	5ml	H <sub>2</sub> O	ad 400ml
H <sub>2</sub> O	ad 1l	H <sub>2</sub> O	ad 1l	pH 8,0 mit 5M NaOH einstellen	
				H <sub>2</sub> O	ad 500ml
<b>1M Tris, pH 8,0</b>		<b>0,5M Tris/3M NaCl</b>		<b>10x TBE</b>	
Tris-Base	121,14g	1M Tris	500ml	Tris-Base	540g
H <sub>2</sub> O	ad 900ml	H <sub>2</sub> O	ad 800ml	Borsäure	275g
pH 8,0 mit 37%iger HCl einstellen		NaCl	175,32g	0,5M EDTA	200ml
H <sub>2</sub> O	ad 1l	H <sub>2</sub> O	ad 1l	H <sub>2</sub> O	ad 5l
<b>Church-Buffer</b>		<b>ss DNA 10mg/ml</b>			
BSA	5g	Heringsperma DNA	500mg		
H <sub>2</sub> O	ad 50ml	H <sub>2</sub> O	ad 50ml		
durch Erwärmen auf 65°C lösen		unter Erwärmen lösen			
1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	193,5ml	autoklavieren			
1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	56,5ml				
20% (w/v) SDS	175ml				
0,5M EDTA, pH8,0	1ml				
ss DNA	5ml				
H <sub>2</sub> O	ad 500ml				

Die Salmon Sperm DNA wurde bei -20°C gelagert und vor Gebrauch für 5min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Der Church Buffer wurde bei 4°C gelagert und vor Verwendung für 2h bei 50°C vortemperierte. Die restlichen Lösungen wurden bei RT gelagert.

### 2.10.11. Northern Blot

Zur Anfertigung der 12% Gele für den Northern Blot wurde das SequaGelSequencing System Kit (National Diagnostics Amersham bzw. GE Healthcare, England) nach Herstellerangaben verwendet:

#### 12% Gel

SequaGel Concentrate	48ml
SequaGel Diluent	42ml
SequaGel Buffer	10ml
TEMED	40µl
10% (w/v) APS	800µl

Das Gel wurde vor Probenbeladung für 20min bei 250V in 1x TBE Puffer (Tabelle 7) vorbehandelt. Ca. 20-30µg RNA (2.10.2., Konzentration ermittelt durch Vergleich mit Marker auf Agarosegel, 2.4.6.) wurden mit 2x Dye (in DEPC-H<sub>2</sub>O, 2.10.2. und Tabelle 1) auf ein maximales Volumen von 40µl angesetzt und in die gespülten Geltaschen eingefüllt. Als Marker dienten 15µl siRNA Marker (NEB, Frankfurt a.M.). Der Gellauf in 1x TBE Puffer erfolgte für 50min bei 300V. Zur Vorbereitung des Blottvorganges wurden vier zugeschnittene Whatman Papiere für 5min in 0,5x TBE (Tabelle 7) und eine BrightStar Plus Positively Charged Nylon Membran (Ambion bzw. life technologies, Darmstadt) für 2min in DEPC-H<sub>2</sub>O (2.10.2.) und 10min in 0,5x TBE inkubiert. In einer Semidry Blotapparatur (Biorad, München) wurde der Northern Blot in folgender Reihenfolge aufgebaut: auf zwei Whatmanpapieren wurde zuerst die Nylon Membran gelegt, gefolgt vom Gel und abschließend mit zwei Whatmanpapieren luftblasenfrei abgedeckt. Geblottet wurde für 30min bei 11V. Nach dem Blottvorgang wurde die Membran auf ein Whatman Papier gelegt, für 5min bei RT getrocknet, für 30sec im UV-Crosslinker fixiert und für 1h bei 80°C gebacken. Die Membran wurde für mind. 1h im Rollinkubator bei 50°C in 15ml Hybridisierungspuffer (Tabelle 7) vorhybridisiert und anschließend über Nacht im Rollinkubator bei 50°C in 15ml Hybridisierungspuffer inklusive 100µl gelabelter Sonde hybridisiert. Die  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol, 10mCi/ml Lead; Perkin Elmer, Rodgau) gelabelte Sonde (Tabelle 19 im Anhang) wurde nach den Herstellerangaben des Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Unterhaching) in 30min bei 37°C hergestellt:

Sondenherstellung

Sonde 1:10	4µl (ca. 100ng)
$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	10µl
10x T4 PNK-Puffer	4µl
H <sub>2</sub> O	21µl
PNK	1µl

Zur Aufreinigung der Sonde wurde eine Sephadex G25 spin column (Roche, Unterhaching) verwendet und für 2min bei 700x g zentrifugiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 60µl 50mM EDTA (Tabelle 7) versetzt, auf die Säule gegeben und erneut für 2min bei 700x g zentrifugiert. Die Membran wurde nach abgeschlossener Hybridisierung für 20min in 5x SSC/1% (w/v) SDS und für mind. 20min in 1x SSC/1% (w/v) SDS (Tabelle 7) gewaschen. Auf die Membran, eingebettet zwischen zwei Folien, wurde der Entwicklerfilm Kodac Biomax MS (Amersham bzw. GE Healthcare, England) für mind. 4 Tage aufgelegt und in einer Entwicklerkassette dunkel bei -80°C gelagert. Die Filmentwicklung erfolgte mittels der CP100 Entwicklmaschine (Agfa, München). Die Menge der aufgetragenen RNA im Northern Blot konnte durch den Nachweis der miRNA21 (mirVana miRNA detection Kit, Ambion bzw. life technologies, Darmstadt) quantifiziert werden. Für die anschließende Hybridisierung der Membran mit der mi21 Loading Sonde wurde die Membran für 10min bei 97°C mit H<sub>2</sub>O-DEPC gestripped, zweimal für 15min mit 1x SSC/1% (w/v) SDS gewaschen und anschließend 1h bei 50°C vorhybridisiert. Die weitere Vorgehensweise der radioaktiven Markierung der miRNA21 Sonde inklusive der Hybridisierung bis hin zur Filmentwicklung erfolgte wie oben beschrieben.

**Tabelle 7**  
**Auflistung aller Northern Blot Lösungen.**

20x SSC		20% (w/v) SDS		1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH7,2	
NaCl	350,6g	SDS	200g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	355,98g
Na <sub>3</sub> Citrat*2H <sub>2</sub> O	176,4g	H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 1l	H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 2l
H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 2l	3h unter Rühren lösen			
1x SSC/1% SDS		5x SSC/1% SDS		0,5x TBE	
20x SSC	50ml	20x SSC	250ml	10x TBE	2,5ml
20% (w/v) SDS	50ml	20% (w/v) SDS	50ml	H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 500ml
H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 1l	H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 1l		
10x TBE		50mM EDTA, pH 8,0		50x Denhardts Solution	
Tris-Base	540g	EDTA	9,31g	BSA	1g
Borsäure	275g	H <sub>2</sub> O	ad 400ml	Polyvinylpyrrolidon K30	1g
0,5M EDTA	200ml	pH 8,0 mit 5M NaOH einstellen		Ficoll 400	1ml
H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 5l	H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 500ml	H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 100ml
ss DNA 10mg/ml		Hybridisierungslösung			
Heringsperma DNA	500mg	20x SSC	75ml		
H <sub>2</sub> O-DEPC	ad 50ml	1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH7,2	6ml		
unter Erwärmen lösen		10% (w/v) SDS	210ml		
autoklavieren		50x Denhardts Solution	6ml		
		ss DNA	3ml		

Alle für den Northern Blot verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-H<sub>2</sub>O (2.4.6.) angesetzt. Die Salmon Sperm DNA wurde bei -20°C gelagert und vor Gebrauch für 5min bei 100°C im Wasserbad gekocht. Die Hybridisierungslösung wurde bei 4°C gelagert und vor Verwendung für 2h bei 50°C vortemperiert. Die restlichen Lösungen wurden bei RT gelagert.

## 2.10.12. Western Blot

100µg Proteinlösung (2.10.6.) wurden mit 6xLämmli Puffer (Laemmli 1970) (Tabelle 8) und 1x TxLyse-Puffer (Tabelle 5) auf ein maximales Volumen von 50µl versetzt, für 5min bei 97°C gekocht und bis zur Auftragung auf Eis gelagert. Die Proben wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen, bestehend aus einem 12%igen Trenngel (unten) und einem 5%igen Sammelgel (oben):

12% Trenngel		5% Sammelgel	
H <sub>2</sub> O	6,6ml	H <sub>2</sub> O	2,7ml
30% Acrylamid	8,0ml	30% Acrylamid	670µl
1,5M Tris/SDS pH8,8	5,2ml	1M Tris/SDS pH6,8	500µl
10% (w/v) APS	200µl	10% (w/v) APS	40µl
TEMED	8µl	TEMED	4µl

Mengenangaben ausreichend für 2 SDS-Gele (Tabelle 8).

Als Marker dienten 10µl des All-Blue Markers (Protein Standard Precision plus All Blue, Biorad, München) oder 10µl High-Ranke Rainbow Marker (Amersham bzw. GE Healthcare, England). Das SDS-Gel lief in einer Mini-Protean 3 Cell Elektrophoresekammer nach Herstellerangaben (Biorad, München) für 1,5-2,5h bei 100V in 1x Elpho-Puffer (Tabelle 8). Zur Vorbereitung des Blottvorganges wurden vier zugeschnittene Whatman Papiere und zwei Blottschwämme für 15min in Transferpuffer (Tabelle 8) inkubiert. Die PVDF Membran (0,45 µm, Merck Millipore, Darmsatdt oder PerkinElmer, Rodgau) wurde für 15sec in Methanol, für 2min in H<sub>2</sub>O und anschließend für 15min in Transferpuffer inkubiert. Der Blot wurde in folgender Reihenfolge aufgebaut: auf einen Schwamm wurden zwei Whatmanpapiere und die Membran gelegt, gefolgt vom Gel, zwei Whatmanpapieren und abschließend einem Schwamm. Die Blothalterung wurde luftblasenfrei verschlossen und so in den Mini-Protean 3 Cell Blottingtank (Biorad, München) eingesetzt, dass die Proteine für 1-2h bei 100V und 300mA auf die Membran geblottet werden. Nach dem Blottvorgang wurde die Membran mit der Proteinseite nach oben auf ein Whatman Papier gelegt, der sichtbare Marker mit einem Kuli nachgezeichnet, die Membran für 15sec in Methanol geschwenkt und für mind. 30min bei RT getrocknet. Nachdem die Membran erneut für 15sec in Methanol geschwenkt wurde, wurde sie auf dem Schüttler für 2min in 1x TBS (Tabelle 8) gewaschen und anschließend für 1h in 2x Roti-Block® (Roth, Karlsruhe) (Tabelle 8) blockiert. Der erste Antikörper CD35 (Clone J3D3 (0,2mg), Beckman Coulter, Krefeld) wurde in einer 1:100 Verdünnung in 5ml 0,2x Roti-Block frisch angesetzt und für 1-2h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 5min in 1x TBST (Tabelle 8) wurde der zweite Antikörper anti-mouse HRP (0,8mg/ml; Dianova, Hamburg) in einer 1:10.000 Verdünnung in 5ml 0,2x Roti-Block frisch angesetzt und für 1h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen für 5min in 1x TBST wurde die Membran, eingebettet zwischen zwei Folien, mit ECL Plus (Amersham bzw. GE Healthcare, England) oder SuperSignalWest (Thermo Scientific, Dreieich) nach Herstellerangaben behandelt und der aufgelegte Film (Amersham bzw. GE Healthcare, England) nach 30sec, 1min, 2 min und 5min entwickelt. Die Filmentwicklung erfolgte mittels der CP100 Entwicklermaschine (Agfa, München). Das tsCR1 Protein (778 aa) zeigte je nach Glykosylierung eine Bande bei mind. 95 kDa (Manzi *et al* 2006). Für die Loading Kontrolle mittels der Detektion des Tubulins in den Proben wurde dieselbe Membran für 15-30sec in Methanol geschwenkt, für 30min in 3x TBE (Tabelle 8) gestripped und dreimalig für 5min in 1x TBS gewaschen. Nach Blockierung in 1x TBST mit 5% MP (Tabelle 8) für 1h bei RT, wurde die Membran dreimal für 5min in 1x TBST gewaschen und mit dem ersten Antikörper anti-Tubulin (20µg/ml; Dianova, Hamburg) in einer 1:150 Verdünnung in 5ml 1x TBS/1%

MP (Tabelle 8) für 1h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Membran gewaschen, für 1h bei RT mit dem zweiten Antikörper anti-mouse-HRP (0,8mg/ml; Dianova, Hamburg) in einer 1:10.000 Verdünnung in 5ml 1x TBS/1% MP inkubiert, gewaschen und eingebettet zwischen zwei Folien mit ECL und aufgelegtem Film nach 5sec, 10sec und 15sec entwickelt.

**Tabelle 8**  
**Auflistung aller Western Blot Lösungen**

1x TBST		1x TBST/1% MP		10x TBS pH 8,0	
10x TBS	100ml	Milchpulver	1g	Tris-Base	24,3g
Tween-20	1ml	TBST	100ml	NaCl	80g
H <sub>2</sub> O	ad 1l			H <sub>2</sub> O	ad 1l
Transferpuffer		10x Elphopuffer		10% APS	
Methanol	200ml	Tris-Base	30,3g	APS	1g
10x Elphopuffer	100ml	Glycin	144g	H <sub>2</sub> O	ad 10ml
H <sub>2</sub> O	ad 1l	SDS	10g		
		H <sub>2</sub> O	ad 1l		
2x Roti-Block		1,5M Tris/SDS pH8,8		1M Tris/SDS pH6,8	
Roti-Block	1ml	Tris-Base	181,70g	Tris-Base	121,14g
H <sub>2</sub> O	4ml	SDS	10g	SDS	10g
		H <sub>2</sub> O	ad 1l	H <sub>2</sub> O	ad 1l
10x TBE in PBS					
Tris-Base	540g				
Borsäure	275g				
0,5M EDTA	200ml				
PBS (2.8.2.)	ad 5l				

Alle Lösungen wurden bei RT gelagert.

### 2.10.13. Coomassie-Staining von SDS-Gelen

Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden auf Polyacrylamidgelen wurde mit einer Coomassie-Lösung gefärbt. Proteinloading und Gellauf erfolgten dabei wie beschrieben (2.10.12.). Das Gel wurde anschließend für 10min in Coomassie-Staining-Lösung auf der Wippe inkubiert. Die Lösung wurde abgekippt und das Gel über Nacht in der Destaining-Lösung auf der Wippe inkubiert.

#### Coomassie-Staining-Lösung

Essigsäure	50ml
Methanol	150ml
Coomassie	1,25g (= 0,25%)
H <sub>2</sub> O	ad 500ml

#### Destaining-Lösung

Essigsäure	50ml
Methanol	150ml
H <sub>2</sub> O	ad 500ml

## 2.11. Funktionelle Analyse-Methoden

### 2.11.1. Lectin-Staining von Zellsuspensionen

Die transduzierten Zellen (2.9.3.) wurden bei Konfluenz mit 1x PBS (2.8.2.) gewaschen, mit 200µl Trypsin pro 6 Well für 5-10min bei 37°C gelöst (2.8.2.) und mit 1ml Medium resuspendiert. Das durch Zentrifugation für 5min bei RT und 1100rpm erhaltene Zellpellet wurde mit 1ml 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Pro Zellpellet wurden 100µl PBA/Lectin (Lectin von *Bandeiraea Simplicifolia* BS, FITC gelabelt; Sigma-Aldrich, Steinheim) (Tabelle 9) zugegeben und im Dunkeln für 1h auf Eis inkubiert (Wu *et al* 1996). Ein Zellpellet wurde mit 100µl PBA (Tabelle 9) ohne Zugabe von Lectin behandelt und diente als Negativprobe. Die Zellen wurden anschließend bei 4°C und 1100rpm zentrifugiert, zweimal mit PBA und darauffolgend einmal mit 1x PBS gewaschen und stets gut resuspendiert. Die Zellen wurden für 15min im Dunkeln auf Eis in 500µl 4% PFA (Tabelle 9) fixiert, mit 1x PBS gewaschen und das Zellpellet abschließend in 500µl 1x PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen (Beckman Coulter, Krefeld) überführt.

**Tabelle 9**  
**Auflistung aller Lösungen für Lectin-Staining.**

PBA		PBA/Lectin		4% PFA	
1x PBS	50ml	PBA	495µl	PFA	4g
BSA	0,5g	Lectin	5µl	1x PBS	100ml
Natriumazid	0,05g	dunkel lagern		unter Rühren bei 100°C lösen sterilfiltrieren	

PBA und PBA/Lectin wurden bei 4°C gelagert. 4%PFA wurde bei -20°C gelagert.

### 2.11.2. Durchflusszytometrie

Die Analyse von 20.000 Zellen pro Probe erfolgte nach Lectin-Staining (2.11.1.) im Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL (Beckman Coulter, Krefeld) bei FL1 670-650nm. Die Auswertung erfolgte durch das Programm WinMDI 2.8.. Dabei wurden 90% der gemessenen nichtinfizierten und ungefärbten PSF Zellen der Kontrollprobe (wt- Lectin) in der Auswertungssoftware als negative, nicht fluoreszierende Zellen markiert, und alle Zellen ab dieser Fluoreszenzschwelle im FL1 als positive fluoreszierende Zellen gewertet (Pfeifer *et al* 2009).



### 2.11.3. Mikroskopie

Die transduzierten Zellen (2.9.3.) wurden auf speziellen Mikroskopierslides (VWR, Darmstadt) wie im Folgenden beschrieben herangezogen, gefärbt und mikroskopiert. Diese Mikroskopierslides sind in 4 gleichgroßen Kammern unterteilt, so dass die gleichzeitige Analyse von 4 Proben unter dem Mikroskop möglich ist. Die Slides wurden hierzu vorher für 1h bei RT mit Kollagenase R (Serva, Heidelberg) beschichtet.

Die infizierten Zellen eines 6 Wells einer 6 Well Zellkulturschale wurden durch trypsinieren abgelöst (2.8.2.) und auf die vier Slidekammern des Mikroskopierslides überführt. Erreichten die Zellen 100% Konfluenz, konnte der Slidekammeraufsatz entfernt werden und das Slide in einer Histologiekammer für Objektträger mit 1x PBS (2.8.2.) für 5min gewaschen werden. Mit Zellstoff wurden die Slidekammerabgrenzung getrocknet und mit einem Fettmarkerstift umrandet. Die Zellkammern, welche mit Lectin gefärbt werden sollten, wurden mit 100µl PBA/Lectin (Tabelle 9) und die Kammer für die Negativprobe wurde mit 100µl PBA (Tabelle 9) für 1h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Das Slide wurde zweimal für je 5min in der Histologiekammer mit PBA und anschließend einmal für 5min mit 1x PBS gewaschen. Erneut wurde die Slidekammerabgrenzung mit Zellstoff getrocknet und mit einem Fettmarkerstift umrandet. Die Kammern wurden mit je 100µl 4% PFA (Tabelle 9) für 15min bei 4°C inkubiert und anschließend einmal für 5min in der Histologiekammer mit 1x PBS gewaschen. Pro Slidekammer wurde ein Tropfen Permaflur Aqueous Mounting Medium Liquid (Beckman Coulter, Krefeld) zugegeben und das Slide mit einem Glasdeckel luftblasenfrei abgeschlossen. Über Nacht trockneten die Slides bei 4°C in einer abgedunkelten Histologiemappe und wurden dann mittels Fluoreszenzmikroskop (Axioskop 2 mit Atto Arc Lichtquelle, HBO-Lampe 100W; AxioCam Kamera und AxioVision Software von Zeiss, Oberkochen) bei einer durchschnittlichen Vergrößerung von 20-40x analysiert.

### 2.11.4. Sulforhodamin B Assay

Das Sulforhodamin-B Assay diente der Färbung von Lebendproteinen und der visuellen Abschätzung des Zellwachstums sowie der Ermittlung von zytotoxischen Effekten. Dafür wurde eine definierte Zellzahl von 46.000 Zellen pro 24 Well ausgesäht, mit Virus transduziert und für 72h inkubiert (2.9.3.). Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen. Pro Well wurden die Zellen mit 250µl 10%iger (v/v) Trichloressigsäure (Tabelle 10) für 30min bei 4°C fixiert. Die Trichloressigsäure wurde anschließend abgekippt, die Wells einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und für 30min bei 50°C

getrocknet. Die Zellen wurden abschließend durch Zugabe von 250µl 0,4%iger (w/v) Sulforhodamin-B-Lösung (Tabelle 10) für 30min bei RT gefärbt. Die Lösung wurde abgekippt und die Wells fünfmal mit 1%iger (v/v) Essigsäure (Tabelle 10) gewaschen. Die Zellkulturplatte wurde erneut für 30min bei 50°C getrocknet und anschließend pro Well 500µl 10mM Tris-HCl Lösung (Tabelle 10) zugegeben. Dieser Schritt löste die gebundenen Farbstoffe. Pro Ansatz wurden 50µl in ein 96 Well einer 96 Well Platte überführt. Mittels ELISA-Plate Reader (Tecan, Crailsheim) konnte abschließend die Farbintensität bei 570nm gegen die Kontrolle aus 50µl 10mM Tris-HCl ermittelt werden. Als Referenzwellenlänge wurden im Plate Reader 620nm und 405nm ausgewählt. Die Absorption wurde auch alternativ direkt im Biophotometer bei 570nm gemessen.

**Tabelle 10**  
**Auflistung der Lösungen für den SRB-Assay.**

1% (v/v) Essigsäure		10% (w/v) Trichloressigsäure		0,4% (w/v) Sulforhodamin B	
Essigsäure	10ml	TCA	10g	SRB	0,2g
H <sub>2</sub> O	990ml	H <sub>2</sub> O	90ml	1% Essigsäure	ad 50ml
		unter Rühren lösen			
		H <sub>2</sub> O	ad 100ml		
10mM Tris-HCl, pH 10,5					
Tris-Base	1,2g				
H <sub>2</sub> O	ad 9ml				
pH 10,5 mit 37%iger HCl einstellen					
H <sub>2</sub> O	ad 10ml				

Alle Lösungen wurden bei RT gelagert.

### 2.11.5. Propidiumiodid-Assay

Lebende Zellen sind in der Lage Propidiumiodid wieder auszuschleusen, in toten Zellen lagert sich der Farbstoff ein. Dadurch konnte nach Zugabe von humanem Serum (NHS), welches humanes Komplement enthält, die Apoptose- und Zelllyserate ermittelt werden. Das NHS (Lagerung -80°C) war ein Serum-Pool von drei Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Pfeifer. Hierfür wurden nach der Blutabnahme die festen Blutbestandteile durch kurze Zentrifugation abgetrennt und das überstehende Serum gepoolt.

Die Zellen wurden in 10cm Zellkulturschalen kultiviert, vom Medium befreit und einmal mit 1x PBS (2.8.2.) gewaschen. Mit 1ml Trypsin wurden die Zellen in 5min bei 37°C abgelöst (2.8.2.), anschließend in 6ml Medium resuspendiert, die Zellzahl ermittelt und nach 5min Zentrifugation bei 1100rpm in 1x PBS zu einer Zellzahl von 100.000 Zellen/100µl gelöst. Die

Proben setzten sich entsprechend folgender Aufstellung zusammen und wurden jeweils für 1h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert:

Probe	1x PBS	4% PFA	NHS	Zellen
ungefärbt	100µl	-	-	100µl
gefärbt	100µl	-	-	100µl
fixiert	-	100µl	-	100µl (maximale Lyserate)
1:1	-	-	100µl	100µl
1:2	50µl	-	50µl	100µl
1:4	75µl	-	25µl	100µl
1:16	93,75µl	-	6,25µl	100µl
1:32	96,88µl	-	3,13µl	100µl

Pro Zellprobe wurden nachfolgend 500µl einer 1:1000 Propidiumiodid-Lösung (Lagerung - 20°C; Labomedic, Bonn) zugegeben und für 20min bei RT inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie (2.11.2.) wurden 20.000 Zellen (FL2 bei 700nm) vermessen und mittels WinMDI2.8 Software ausgewertet und die % tote Zellen (PI-positiv) ermittelt. Als Kontrollen für die Methode wurden HEK293T Zellen und *igal*<sup>-/-</sup> Zellen (2.8.1.) verwendet, welche durch das Fehlen der  $\alpha$ gal Epitope vom NHS unberührt und nicht lysiert werden sollten.

#### 2.11.6. Chrom-Release

Der <sup>51</sup>Chrom-Release Assay zur Analyse von Zelllyse von transduzierten PSF Zellen durch humanes Komplement (NHS) wurde nach dem Protokoll der AG Schwinzer in der MH Hannover durchgeführt (Niemann *et al* 2001). Die Zellen wurden dabei mit radioaktivem <sup>51</sup>Chrom inkubiert und unter NHS-Zugabe die freigesetzte Menge an radioaktivem <sup>51</sup>Chrom als Maß für die Zelllyserate gemessen. Das humane Komplement wurde hierbei in aufgereinigter Form verwendet.

## 2.12. Generierung transgener Schweine

Die Generierung transgener Schweine erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Wolf unter der Leitung von Dr. Barbara Keßler (Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, München). Mittels der auf Trockeneis versendeten Virusaliquots wurden nach dem Protokoll der AG Wolf (Aigner und Wolf 2010, Giraldo *et al* 2012) die subzonalen Injektionen bis hin zum Embryonaltransfer durchgeführt (ET Tabelle 17 im Anhang). Bei der Methode NT (Nukleustransfer oder Kerntransfer) wurden fPSF#14 Zellen mit ein- bis dreimal 600ng Virus-RT transduziert (2.9.3.), kultiviert bis zur vollständigen Konfluenz und zur Arbeitsgruppe von Prof. Wolf versendet, wo der anschließende Kerntransfer und Embryonaltransfer durchgeführt wurde (NT Tabelle 18 im Anhang). Die fPSF#14 Zellen wurden dafür auf Kollagen R (Serva, Heidelberg) beschichtete Zellkulturschalen kultiviert. Hierfür wurde pro 6well einer 6well Platte 1ml Kollagen R zupipettiert, über Nacht bei RT inkubiert, abgenommen und die Platten bei 4°C bis zur Verwendung gelagert. Das verwendete Zellkulturmedium bestand aus DMEM 61965 (Gibco, Karlsruhe), versetzt mit 20% (w/v) FBS (Biochrom AG, Berlin), 1% Pen/Strep (Biochrom AG, Berlin), 1% L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin), 1% Sodiumpyruvat (Biochrom AG, Berlin), 1% NEAA (Biochrom AG, Berlin) und  $\beta$ -ME (1:10.000 in 1x PBS; Biochrom AG, Berlin).

### 2.12.1. Ohrprobengewinnung und Organentnahme

Zur Analyse der geborenen Ferkel auf Transgenität wurden den lebenden Tieren ca. 0,5cm<sup>2</sup> kleine Ohrstücke herausgestanzt und bei -20°C gelagert. Mittels Skalpell wurden diese Ohrstücke weiter zerkleinert und die Hautgewebestücke zur Analyse von DNA (2.10.8.) und RNA (2.10.2.) den Protokollen entsprechend weiter behandelt.

Bei der Organentnahme verstorbener oder getöteter Ferkel (Lagerung bei -20°C) wurden diese auf Eis langsam aufgetaut (mind. 24h) und kleine Organstücke entnommen, zerkleinert, die Gewebestücke ausaliquotiert und wieder bei -20°C gelagert oder zur Analyse von genomischer DNA (2.10.8.) und RNA (2.10.2.) den Protokollen entsprechend weiter behandelt.

### 3. Ergebnisse

Um den bestmöglichen Knockdown der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase ( $\alpha$ GT) zu erreichen, wurde die Struktur der  $\alpha$ GT mRNA untersucht, um die siRNA Bindungsstellen für einen optimalen RNAi Effekt zu ermitteln. Nachfolgend wurden shRNA exprimierende lentivirale Vektoren generiert und *in vitro* auf den Knockdown der  $\alpha$ GT mRNA hin untersucht. Durch Generierung von PSF Zellklonen wurde die Stabilität des Knockdowns analysiert. Lentivirale Vektoren mit der shRNA Expressionskassette, kombiniert mit den Expressionskassetten für das komplementregulatorische Protein tsCR1 (trunkierte lösliche Form des Complement Rezeptors 1) sowie für EndoGalC (Endo- $\beta$ -galactosidase C) wurden in PSF Mischpopulationen und PSF Zellklonen untersucht. Letztlich wurden ausgewählte Lentivirale Vektoren zur Generierung multitransgener Schweine herangezogen und die Knockdown Effekte *in vivo* untersucht.

#### 3.1. Lentiviraler Knockdown der $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase

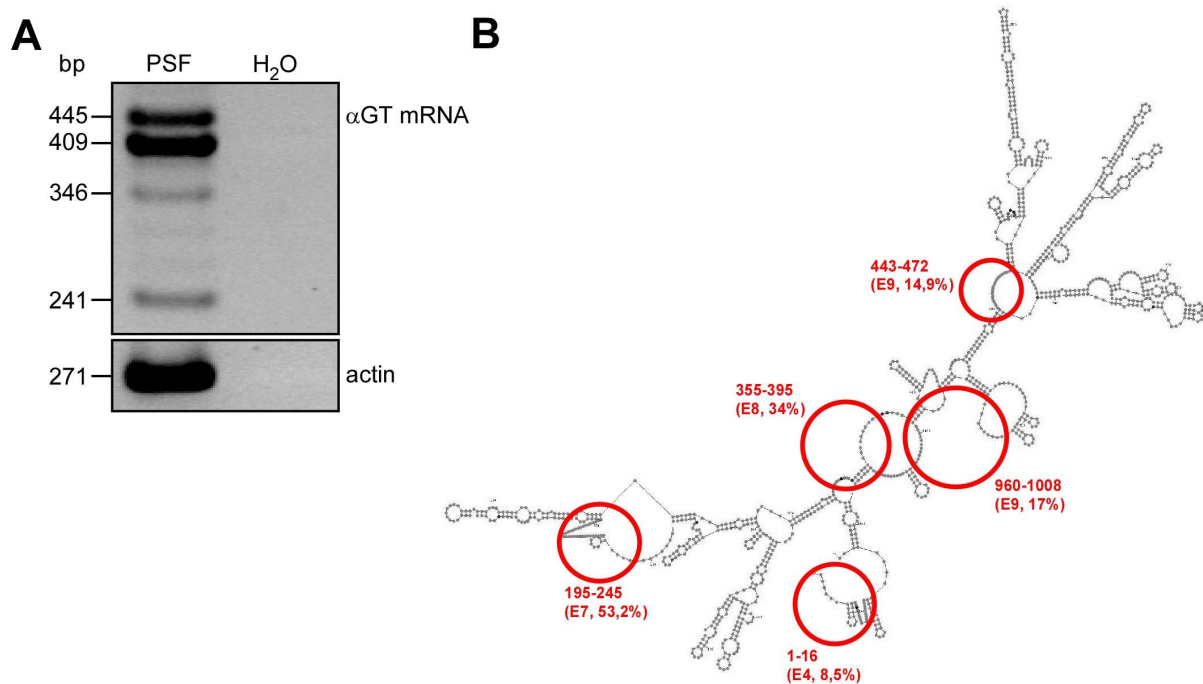
Die Reduktion der  $\alpha$ -gal Epitope (Knockdown) auf den Oberflächen der Schweinehautzellen (porcine skin fibroblasts, PSF Zellen) wurde nach der Transduktion mit verschiedenen lentiviralen shRNA-Vektorkonstrukten, gerichtet gegen die  $\alpha$ GT, untersucht.

##### 3.1.1. Analyse der $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA

Für die Ermittlung potentieller Zielsequenzen der zu entwickelnden siRNAs erfolgte im ersten Schritt die Analyse der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA ( $\alpha$ GT mRNA) hinsichtlich ihrer Expression in den Zielzellen und der Sekundärstruktur der mRNA. Die PCR-Analyse (2.4.14) der  $\alpha$ GT mRNA in den verwendeten PSF Zellen unter Verwendung der Primer GT\_fw/GT1\_rev (Tabelle 20 im Anhang, Katayama *et al* 1998) zeigte wie erwartet vier Haupt-Splicevarianten (Abbildung 12A, siehe auch Abbildung 6B), von denen die Splicevarianten Exon 4-9 (entspricht dem 445bp PCR-Fragment) und  $\Delta$ Exon5 (Splicevariante mit Exone 4-9 aber ohne Exon 5; 409bp) in höherer Menge vertreten waren als die Splicevarianten  $\Delta$ Exon5-6 (346bp) und  $\Delta$ Exon5-7 (241bp) (Katayama *et al* 1998). Da alle Splicevarianten der  $\alpha$ GT mRNA stets die Exone 4, 8 und 9 trugen, dienten diese Exone im

weiteren Verlauf der Experimente als Haupt-Targets der siRNA Entwicklung (Katayama *et al* 1998).

Mittels der von Zuker *et al* veröffentlichten Internetplattform (2.3.1.) konnten 47 verschiedene  $\alpha$ GT mRNA Sekundärstrukturen (E4-9, 1115 Basen mRNA der kompletten Exone 4-9 inkl. Start und Stop Codon) ermittelt werden, welche unterschiedliche doppelsträngige und einzelsträngige RNA Bereiche aufzeigten (Abbildung 12B als ein Beispiel aus 47 Möglichkeiten). Die kurzen Abschnitte in den Exons 4 (Base 1-16), 7 (Base 195-245), 8 (Base 355-395) und 9 (Basen 443-472 und 960-1008) zeichneten sich in 39 von 47  $\alpha$ GT mRNA Sekundärstrukturen durch hohe Wahrscheinlichkeiten einzelsträngiger Bereiche aus (im Beispiel in Abbildung 12B: 14,9% bis 53,2% rot markiert). Da diese mRNA Bereiche optimale Bindungsstellen für den RISC-siRNA Komplex darstellen und somit dem Silencing Prozess förderlich sein sollten, dienten sie im weiteren Verlauf der Experimente als Haupt-Targets der siRNA Entwicklung.



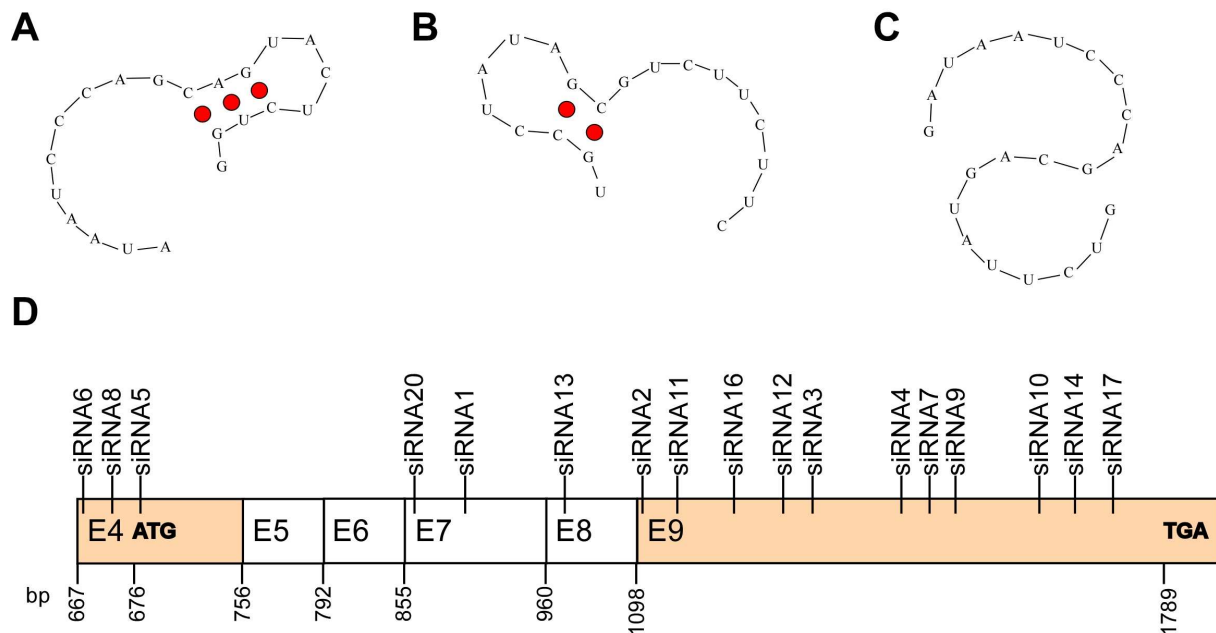
**Abbildung 12**

**Analyse der vier Hauptsplicevarianten der  $\alpha$ GT mRNA sowie Darstellung einer typischen  $\alpha$ GT mRNA Sekundärstruktur.**

(A) Auftragung der DNA-Fragmente auf ein Agarosegel nach PCR von porciner gDNA mittels der Primerpaare GT\_fw/GT1\_rev und actin\_fw/actin\_rev (Tabelle 20 im Anhang). (B) Darstellung einer typischen  $\alpha$ GT mRNA Sekundärstruktur nach mfold (Exon 4-9, 1115 Basen). Einzelsträngige Bereiche der Exons 4, 7, 8 und 9 wurden als Beispiele für hohe Wahrscheinlichkeiten einzelsträngiger Bereiche der  $\alpha$ GT mRNA rot markiert.

### 3.1.2. siRNA Design

Für das Design der siRNA Sequenzen wurden die Beschaffenheit der Sekundärstruktur der siRNA (antisense Strang) (Zucker *et al* 2003, Mathews *et al* 2004), die thermodynamische Stabilität der siRNA Duplex Enden (Heale *et al* 2005), der GC Gehalt der siRNA, die Tools von siRNA-Design Firmen (EuroGeneTech, B-Bridge) sowie die Kriterien nach Reynolds (Reynolds *et al* 2004) verwendet (2.3.2.). Die durch Reynolds *et al* beschriebenen Kriterien einer 19 Basen langen siRNA erzielten hohe Knockdown Raten der Ziel mRNA (Reynolds *et al* 2004). Um dies zu ermöglichen sollte möglichst an Position 3 der sense-siRNA die Base A oder U stehen, an Position 10 die Base U, an Position 13 A, U oder C, an Position 19 die Base A und bestmöglich sollte die siRNA mit A oder U an den letzten 3 Basen enden. Die designten siRNAs 1-7 wurden nach Beachtung der Reynolds-Kriterien generiert (Tabelle 15 im Anhang). Die Sekundärstrukturen (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) der sieben entsprechenden antisense-siRNAs, welche direkt an die  $\alpha$ GT mRNA binden, ergaben jedoch teilweise mehrfache interne Basenpaarungen (Abbildung 13A als ein Beispiel). Da lange 3' Überhänge bei vorhandenen kleineren Basenpaarungen (Abbildung 13B als ein Beispiel) sowie das völlige Fehlen einer Sekundärstruktur (Abbildung 13C als ein Beispiel) die  $\alpha$ GT mRNA Zielsequenzbindung begünstigen und somit den Silencing Effekt erhöhen könnten, wurden durch Verschiebungen der siRNA Bindungsstelle an der  $\alpha$ GT mRNA um  $\pm$  drei Basen die Strukturbildung unter Beachtung der Reynolds Kriterien optimiert und dadurch weitere siRNAs designt. Zeitgleich wurde die thermodynamische Stabilität der 5' Enden der Duplex-siRNAs berücksichtigt. Mittels dem von Heale entwickelten Duplex-End Energy Difference Calculator (<http://saturn.coh.org:8080/calc/index.php>) wurden die kcal/mol Werte der 5' antisense RNA ermittelt. Je positiver die Werte ausfielen, umso instabiler könnte das 5' antisense RNA Ende und dadurch die Strangbindung durch den RISC ausfallen (Heale *et al* 2005) (Tabelle 15 im Anhang). Mittels dem Internetlink <http://www.genelink.com/tools/gltm.asp> konnte der GC Gehalt und die Schmelztemperatur  $T_m$  errechnet werden. Der GC Gehalt der siRNAs sollte zwischen 30-52% und die Schmelztemperatur so gering wie möglich sein.

**Abbildung 13****Design der siRNAs für den αGT mRNA Knockdown.**

(A) siRNA mit ungünstiger Sekundärstruktur nach Reynolds *et al* am Beispiel der siRNA7. (B) siRNA mit günstigerer Sekundärstruktur durch langem 3' Überhang und kleinem Basenpaarungsbereich am Beispiel der siRNA20. (C) siRNA mit günstigster Sekundärstruktur ohne interne Basenpaarungen am Beispiel der siRNA9. (D) Schematische Darstellung der Bindungsstellen der 17 selbst designten siRNAs auf der αGT mRNA. Nicht eingezeichnet: siRNAs 15, 16 und 18. Diese konnten nicht erfolgreich kloniert und daher nicht weiter untersucht werden. Die Sequenzen und Eigenschaften sind in Tabelle 15 im Anhang aufgeführt.

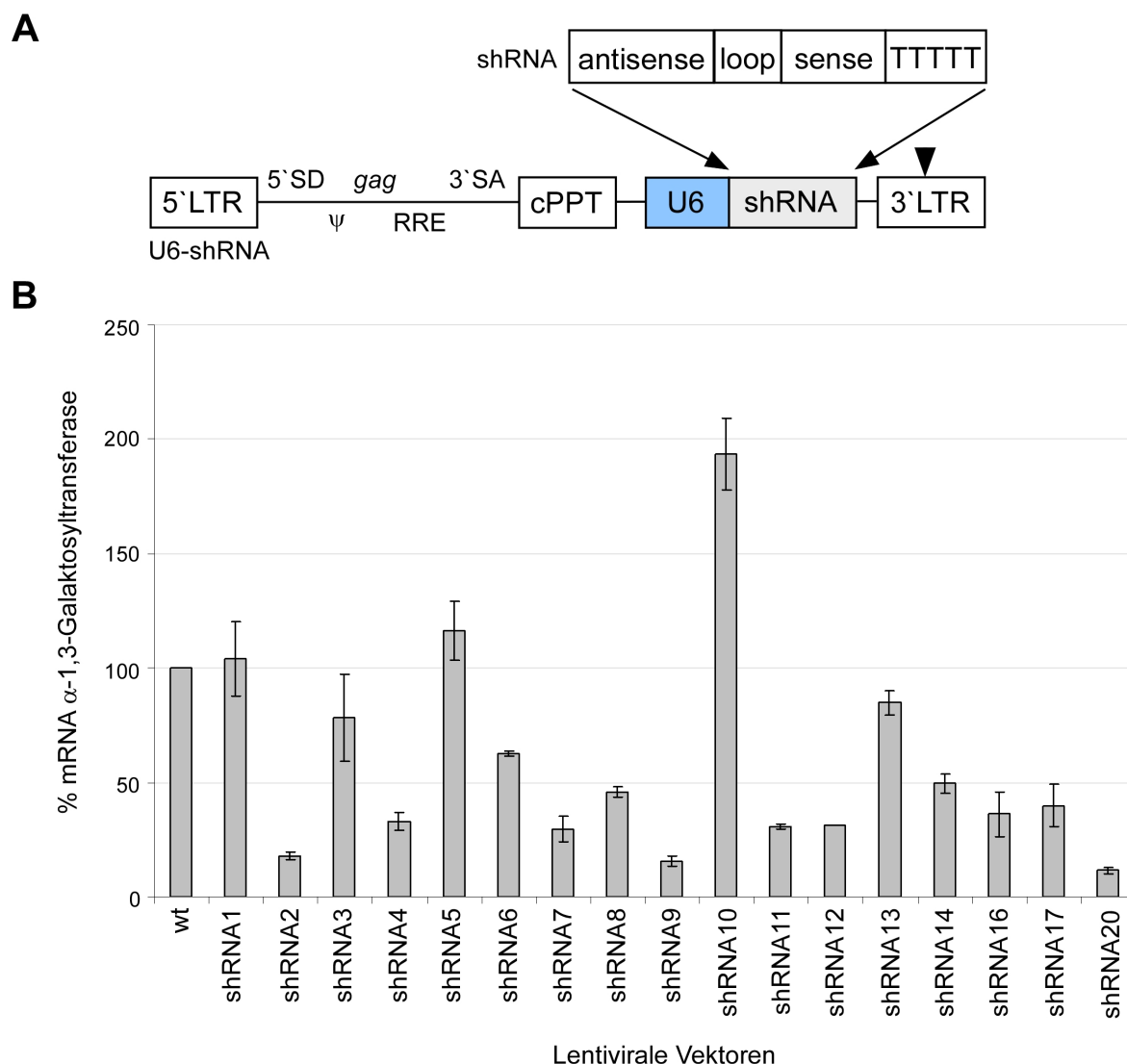
Durch diese diversen Kriterien ergaben sich die siRNA Sequenzen 8-12 (Tabelle 15 im Anhang). Die siRNAs 13-14 wurden von der Firma EuroGeneTech (Köln) und 16-17 von der Firma B-Bridge (USA und Heidelberg) nach deren Algorithmen entwickelt. Die siRNA 20 stammte von Zhu *et al* und galt als Positivkontrolle für einen bereits nachgewiesenen αGT mRNA knockdown (Zhu *et al* 2005 und 2008). Die Bindungsstellen aller siRNAs an der αGT mRNA wurde in Abbildung 13D schematisch dargestellt.

Die insgesamt 18 verschiedenen siRNAs (Tabelle 15 im Anhang) hatten Zielsequenzen auf der αGT mRNA vom Start bis Stop Codon (Abbildung 13D). Da neben dem Exon 8 die Exons 4 und 9 in allen Splicevarianten der αGT mRNA vorkommen (Katayama *et al* 1998) und Exon 9 für die enzymatische Aktivität des Enzyms codiert, wurden besonders viele siRNAs für diese Abschnitte designt. Zudem könnte aufgrund der Sekundärstrukturen der αGT mRNA in den Exonen 7, 8 und 9 (3.1.1.) die siRNA Bindung an Einzelstrangbereiche erfolgen und den Erfolg auf einen hohen RNAi Effekt steigern (Abbildung 12B).



### 3.1.3. Screening der lentiviralen U6-shRNA Expressionskassetten

Die Klonierung der 18 siRNAs (3.1.2.) erfolgte als shRNA in antisense-loop-sense Orientierung mit zwei verschiedenen Loops (TTCAAGAGA oder CCACACC). In Abbildung 14A ist das verwendete lentivirale Backbone des Hplm Vektors mit der U6-shRNA Expressionskassette schematisch dargestellt.



**Abbildung 14**

#### Screening verschiedener lentiviraler U6-shRNA Vektoren.

(A) Schematische Darstellung des lentiviralen Vektors mit U6-shRNA Expressionskassette und shRNA Orientierung. (B) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt). Die Transduktion der PSF-Zellen erfolgte mit 200ng Virus (RT) mit den aufgelisteten shRNAs unter Kontrolle des U6-Promoters. 3 Tage nach Transduktion erfolgte die RNA Isolation und cDNA-Synthese, gefolgt von der Analyse mittels quantitativer Real-Time PCR.  $n > 3$ , MW  $\pm$  SEM (Ausnahme shRNA12 mit  $n=2$ ). ▼ SIN Mutation.

In allen (auch nachfolgend beschriebenen) Experimenten erfolgte wenn nicht anders angegeben nach der Produktion der verschiedenen lentiviralen Konstrukte (Klonierung der

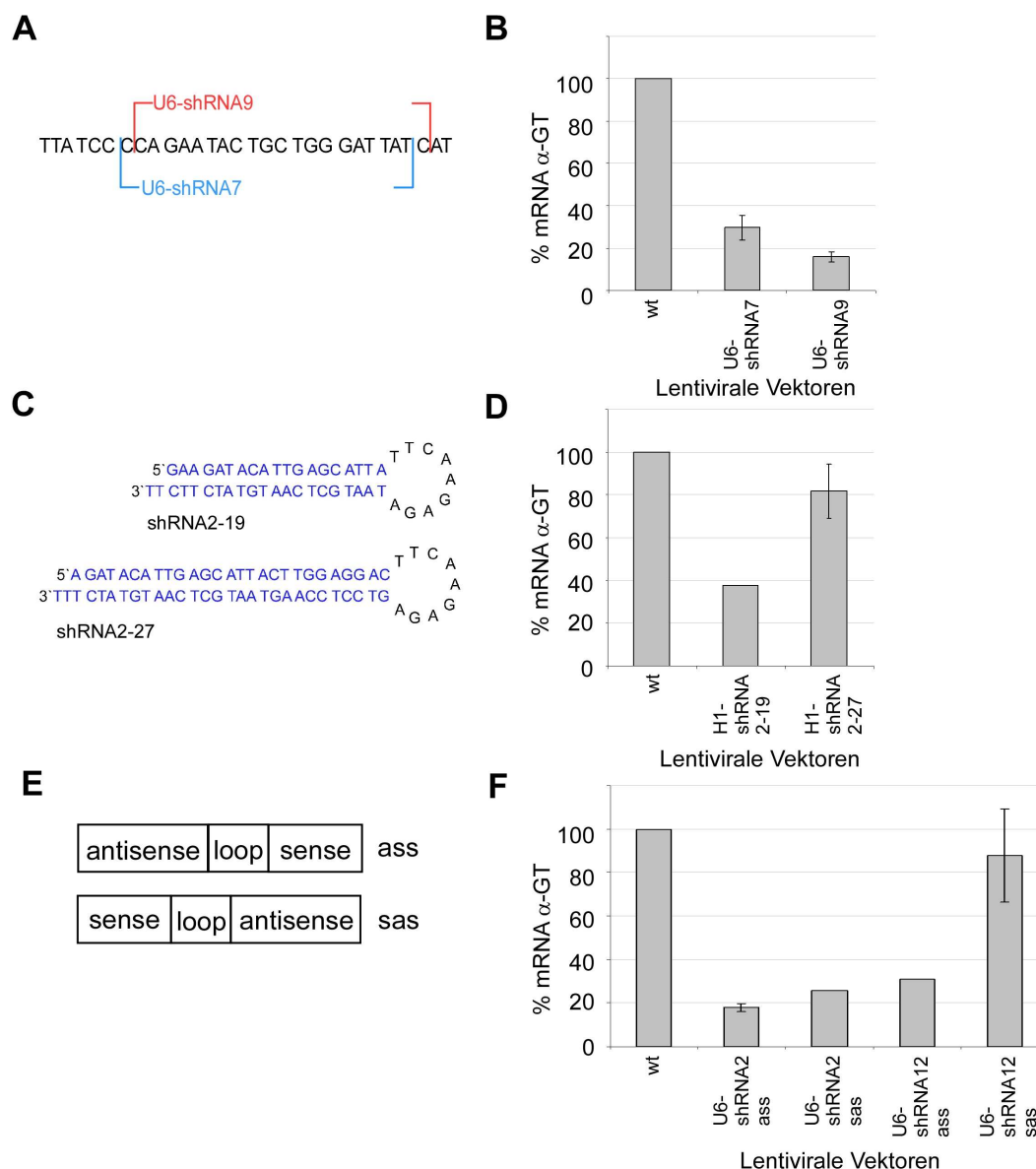
lentiviralen Plasmide siehe 2.6., Herstellung viraler Vektoren siehe 2.9.1.) die Transduktion (2.9.3.) der PSF Zellen mit gleichen physikalischen Virusmengen (2.9.2.). Nach dreitägiger Inkubation der infizierten Zellen wurde durch RNA-Isolation (2.10.2.) und cDNA-Synthese (2.10.3.) die  $\alpha$ GT mRNA Level mittels Real-Time-PCR (2.10.4.) bestimmt (Abbildung 14B). Die Vektoren mit U6-Promoter und der shRNA1 ( $104,16\% \pm 16,21$ ) und shRNA5 ( $116,20\% \pm 12,78$ ) zeigten keinen Effekt auf die  $\alpha$ GT mRNA Konzentration. Die shRNA10 zeigte hingegen sogar ein erhöhtes  $\alpha$ GT mRNA Level ( $193,65\% \pm 15,60$ ). Die shRNA13 und 14 der Firma EuroGeneTech (Köln) waren in der Lage, die  $\alpha$ GT mRNA auf  $84,74\% \pm 5,35$  und  $49,54\% \pm 3,99$  zu reduzieren. Die shRNA16 und 17 der Firma B-Bridge (USA und Heidelberg) reduzierten die  $\alpha$ GT mRNA Expression auf  $36,15\% \pm 9,94$  bzw.  $39,86\% \pm 9,13$ . Höhere knockdown Raten der  $\alpha$ GT mRNA um ca. 2/3 wurden durch die selbst designten shRNA4 ( $33,02\% \pm 4,04$ ), 12 ( $31,06\%$ ,  $n=2$ ), 11 ( $30,82\% \pm 1,10$ ) und 7 ( $29,61\% \pm 5,78$ ) erreicht. Die besten Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA Level waren durch die shRNA2 ( $17,98\% \pm 1,73$ ), 9 ( $15,80\% \pm 2,21$ ) und 20 ( $11,58\% \pm 1,41$ ) zu verzeichnen (Abbildung 14B).

### 3.1.4. Optimierung der lentiviralen shRNA Konstrukte

#### 3.1.4.1. Änderung der shRNA Kassette

Nach dem ersten Screening wurde eine weitere Optimierung der shRNA-Kassetten angestrebt und hierfür verschiedene Gesichtspunkte beleuchtet und genauer analysiert. So konnte durch eine minimale Verschiebung der Bindungsstelle der siRNA an die  $\alpha$ GT mRNA (2.3.2.) um eine Base nach rechts eine Verstärkung des Knockdowns von  $29,61\% \pm 5,79$  (shRNA7) auf  $15,80\% \pm 2,21$  (shRNA9) erzielt werden (Abbildung 14B bzw. 15A und 15B).

Wurde eine Länge der siRNA von 27 Basen (Elbashir *et al* 2001) statt der üblichen 19 (Kim *et al* 2005), verwendet, verschlechterte sich der  $\alpha$ GT mRNA Knockdown von  $81,79\% \pm 12,69$  (shRNA2-27) auf  $37,89\%$  (shRNA2-19) (Abbildung 15C und 15D). Zusätzlich wurde untersucht, ob der Knockdown Effekt durch die Klonierungsorientierung der shRNA im Vektor (antisense-loop-sense (ass) versus sense-loop-antisense (sas)) verstärkt werden könnte (Abbildung 15E) (Harborth *et al* 2003). Der Knockdown Effekt wurde jedoch durch die geänderte Orientierung verringert (shRNA2:  $17,98\% \pm 1,73$  (ass) zu  $25,72\%$  (sas); shRNA12:  $31,06\%$  (ass) zu  $87,81\% \pm 21,30$  (sas)) (Abbildung 15F). Als Fazit lässt sich sagen, dass keine Änderungen hinsichtlich des  $\alpha$ GT mRNA Knockdown Effektes zu beobachten waren.

**Abbildung 15****Änderungen der shRNA Kasette der lentiviralen shRNA Konstrukte.**

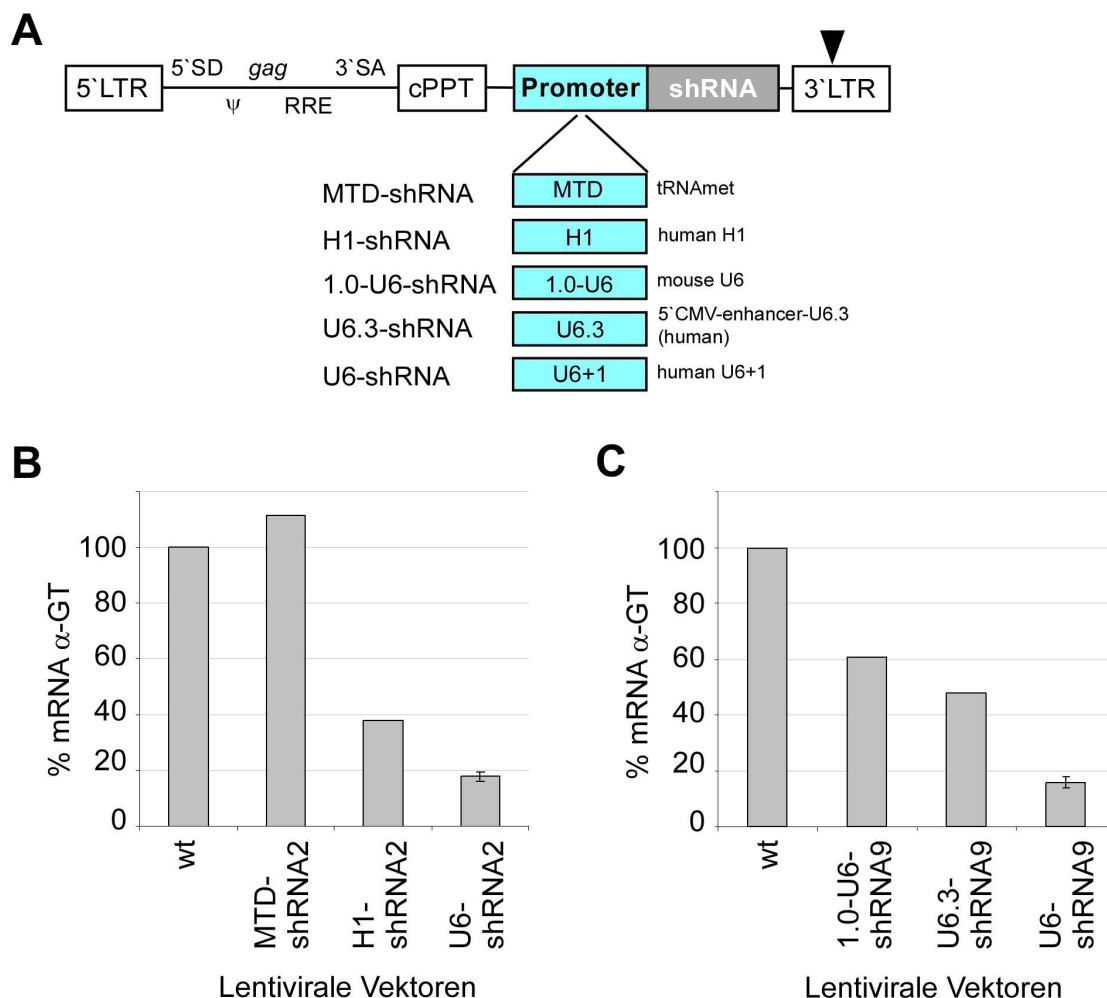
(A) Bindungsstelle der siRNA7 und siRNA9 auf der  $\alpha$ GT mRNA. (B) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt),  $n > 3$ , MW  $\pm$  SEM. (C) Schematische Darstellung der shRNA2 mit 19bp siRNA Länge (shRNA2-19) und Verlängerung der siRNA-Sequenz auf 27bp (shRNA2-27). (D) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), MW  $n = 3 \pm$  SEM (Ausnahme shRNA2-19 mit  $n = 1$ ). Hier wurde der H1-Promoter verwendet (siehe 3.1.4.2.). (E) Klonierungsorientierung der shRNA in antisense-loop-sense (ass) und sense-loop-antisense (sas) Orientierung. (F) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt),  $n = 3$ , MW  $\pm$  SEM (Ausnahme shRNA12 (ass)  $n = 2$ , shRNA2 (sas)  $n = 2$ ).

**3.1.4.2. Verwendung verschiedener Promotoren zur shRNA-Transkription**

Da die Knockdownrate der  $\alpha$ GT mRNA von der Stärke des Promoters für die shRNA Transkription abhängig ist, wurden neben dem U6 Promoter (Mäkinen *et al* 2006) weitere in eukaryotischen Zellen gut exprimierende Promotoren wie MTD (Boden *et al* 2003), H1

(Brummelkamp *et al* 2002), 1.0-U6 (Ambion bzw. life technologies, Darmstadt) oder U6.3 (GenScript, USA) getestet (siehe 2.5. und im Anhang 6.3.) (Abbildung 16A).

Unter Verwendung der shRNA2 zeigte der MTD Promoter keine Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA Expressionslevel (111,36%) (Abbildung 16B). Die Expressionsrate konnte um über 60% mit dem H1 Promoter auf 37,89% reduziert werden und die stärkste Reduktion auf 17,98%  $\pm$  1,73 wurde durch Verwendung des U6 Promoters erzielt (Abbildung 16B). Im Folgenden wurden die verschiedenen U6 Promotoren hinsichtlich des Knockdowns der  $\alpha$ GT mRNA unter Verwendung der shRNA9 getestet (Abbildung 16C): Die stärkste  $\alpha$ GT mRNA Reduktion auf 15,80%  $\pm$  2,21 konnte durch den U6 Promoter gezeigt werden, gefolgt von dem U6.3 Promoter mit 47,90% und dem 1.0-U6 Promoter mit 60,67% (Abbildung 16C).



**Abbildung 16**

**Änderungen der Promotoren mit dem Ziel der Optimierung der lentiviralen shRNA Konstrukte.**

(A) Schematische Darstellung des lentiviralen Hplm Vektors mit den verschiedenen Promotoren. (B) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), n=3, MW  $\pm$  SEM (Ausnahme siRNA2 unter MTD Promoterexpression (n=2), unter H1 Expression (n=1)). (C) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), n>3, MW  $\pm$  SEM (Ausnahme siRNA9 unter 1.0-U6 Promoterexpression (n=2), unter U6.3 Expression (n=2)). ▼ SIN Mutation.

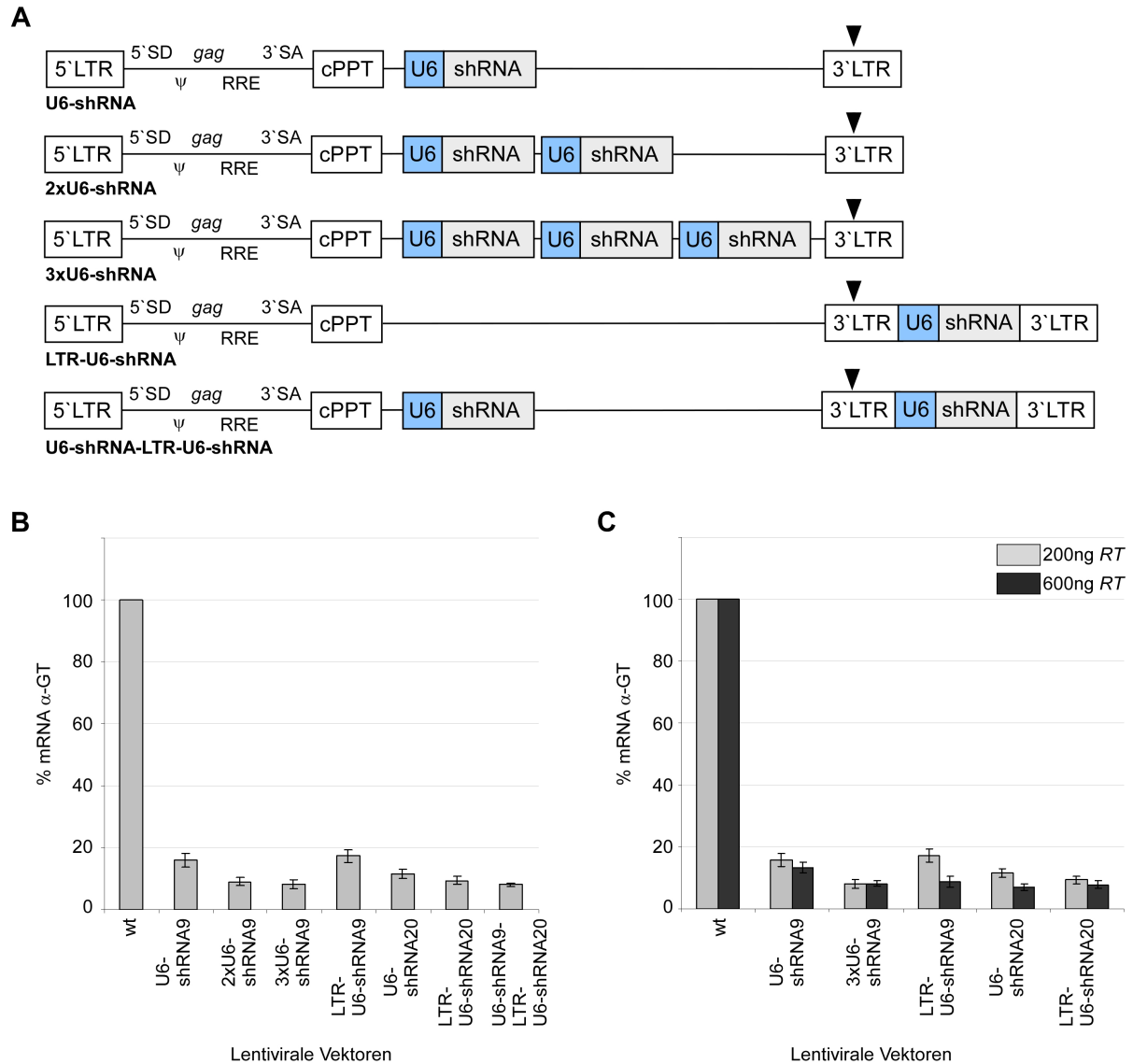
Die aufgezeigten Änderungen der Promotoren ergaben insgesamt keine weiteren Reduktionen des  $\alpha$ GT mRNA Knockdown Effektes entsprechend der Stichproben mit den shRNA2 und 9. Es wurde daher auf weitergehende Untersuchungen unter Verwendung anderer shRNAs verzichtet. Insgesamt zeigte der U6-Promoter den stärksten Effekt.

### 3.1.4.3. Änderung der Anzahl an shRNA Kassetten und Lokalisation im lentiviralen Vektor

Neben der Klonierung der shRNA Expressionskassette in die Multiple Cloning Site (MCS) des lentiviralen Vektors wurde auch die Möglichkeit der Klonierung in die Long terminal Repeats (LTR) genutzt. Der Vorteil der Expressionskassette in der LTR ist eine Verdopplung dieser durch den Prozess der reversen Transkription (1.2.). Außerdem wurde die Anzahl der U6-shRNA Expressionkassetten in der MCS erhöht. Auf dieser Grundlage wurden diverse neue lentivirale Konstrukte generiert (Abbildung 17A) und hinsichtlich des Knockdown Effektes analysiert (Abbildung 17B). Zusätzlich wurden auch die dreifachen Virusmengen (von 200ng auf 600ng *RT*) appliziert, um den Effekt auf den Knockdown zu überprüfen (Abbildung 17C). In allen Fällen wurde mit den shRNA9 und 20 gearbeitet, weil diese in den vorangegangenen Analysen der  $\alpha$ GT mRNA Expression die stärksten Knockdown Effekte erzielten (3.1.3. und Abbildung 14).

Die  $\alpha$ GT mRNA Reduktion stieg mit zunehmender Anzahl Expressionskassetten im Wirtszellgenom (von U6-shRNA9  $15,80\% \pm 2,21$  über 2xU6-shRNA9  $8,98\% \pm 1,31$  auf 3x U6-shRNA9  $8,12\% \pm 1,50$   $\alpha$ GT mRNA level gegenüber wt) (Abbildung 17B). Die Verwendung des U6-shRNA Konstruktes in der LTR gegenüber der MCS ergab kaum einen Vorteil, da ähnliche mRNA Level erzielt wurden ( $17,24\% \pm 2,05$  bei LTR-Klonierung versus  $15,80\% \pm 2,21$  bei MCS Klonierung einer Kassette). Die Erhöhung von zwei auf drei Expressionskassetten erzielte kaum noch zusätzliche Steigerungen hinsichtlich der  $\alpha$ GT mRNA Reduktion (von 2xU6-shRNA9 mit  $8,98\% \pm 1,31$  auf 3xU6-shRNA9 mit  $8,12\% \pm 1,50$ ) (Abbildung 17B). Auch durch Verwendung von zwei verschiedenen shRNAs in der MCS und in der LTR des lentiviralen Konstrukts (Abbildung 17A) zeigte sich kaum einen Vorteil gegenüber der Verwendung von zwei identischen shRNAs in der MCS bzw. der Verwendung des LTR-Konstruktes: Die  $\alpha$ GT mRNA level wurden nur minimal stärker reduziert (U6-shRNA9-LTR-U6-shRNA20 mit  $8,00\% \pm 0,49$  versus 2xU6-shRNA9 mit  $8,98\% \pm 1,31$  versus LTR-U6-shRNA20 mit  $9,32\% \pm 1,29$ ) (Abbildung 17B). Bei zusätzlicher Verdreifachung der Virustransduktionsmenge von 200ng auf 600ng Virus-*RT* (Abbildung

17C) konnten ebenfalls kaum stärkere Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA erzielt werden (von  $15,80\% \pm 2,21$  auf  $13,41\% \pm 1,82$  für U6-shRNA9; von  $8,12\% \pm 1,50$  auf  $8,16\% \pm 0,96$  für 3xU6-shRNA9; von  $11,58\% \pm 1,41$  auf  $7,07\% \pm 0,95$  für U6-shRNA20 und von  $9,32\% \pm 1,29$  auf  $7,77\% \pm 1,28$  für LTR-U6-shRNA20). Einzige Ausnahme bildete die fast doppelte Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA bei Verwendung von 200ng bzw. 600ng Virus-RT des LTR-U6-shRNA9 Konstruktes (von  $17,24\% \pm 2,05$  auf  $8,74\% \pm 1,88$ ) (Abbildung 17C).



**Abbildung 17**

**Änderungen der Anzahl und Lokalisation der U6-shRNA Kassetten zur Optimierung der lentiviralen shRNA Konstrukte.**

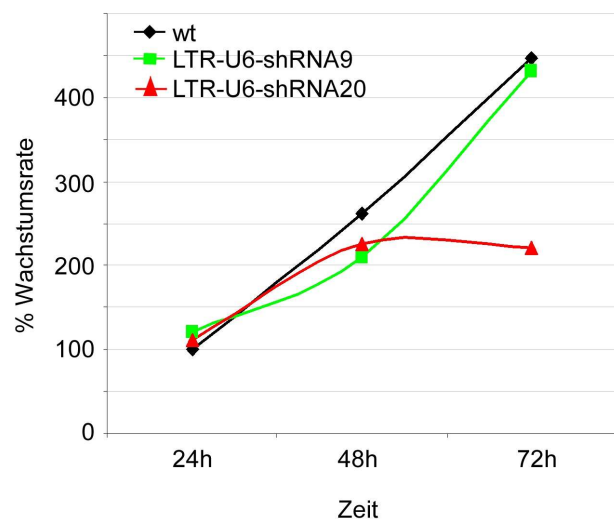
(A) Schematische Darstellung der klonierten lentiviralen Vektoren mit ein bis drei U6-shRNA Expressionskassetten. Es wurden die shRNA9 und 20 verwendet. (B) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt),  $n=3$ , MW  $\pm$  SEM. Transduktion der PSF mit 200ng Virus-RT. (C) Real Time PCR Daten zur  $\alpha$ GT mRNA Expressionsrate in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng bzw. 600ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt),  $n=3$ , MW  $\pm$  SEM. ▼ SIN Mutation.

Insgesamt wurde die stärkste  $\alpha$ GT mRNA Reduktion unter Verwendung der U6-shRNA9 Kassette mit Transduktion von 600ng des LTR-U6-shRNA9 Konstruktes ( $8,74\% \pm 1,88$ ) erreicht. Die stärkste  $\alpha$ GT mRNA Reduktion unter Verwendung der U6-shRNA20 Kassette wurde mit Transduktion von 600ng des U6-shRNA20 Konstruktes ( $7,07\% \pm 0,95$ ) erreicht (Abbildung 17C).

### 3.1.5. Funktionelle Analysen der PSF Mischpopulationen

#### 3.1.5.1. Zellwachstum transduzierter PSF Mischpopulationen

Neben erfolgreicher Reduktion des  $\alpha$ GT mRNA levels spielt auch die Vitalität der transduzierten Zellen eine entscheidende Rolle. Es wurde beobachtet, dass durch Infektion der PSF Zellen mit den LTR-U6-shRNA20 Vektoren stets eine Verschlechterung der Wachstumsraten der Zellen zu verzeichnen war. Die Analyse der Sterberate der Zellen durch den Sulforhodamin B Assay (2.11.4.) zeigte ein Absinken der Wachstumsrate innerhalb von 72h nach Transduktion (2.9.3.), wohingegen die LTR-U6-shRNA9 infizierten Zellen weiterhin eine dem Wildtyp (wt) entsprechende Wachstumsrate aufwiesen (Abbildung 18). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere Versuche mit U6-shRNA9 und LTR-U6-shRNA9 codierenden Vektoren durchgeführt.

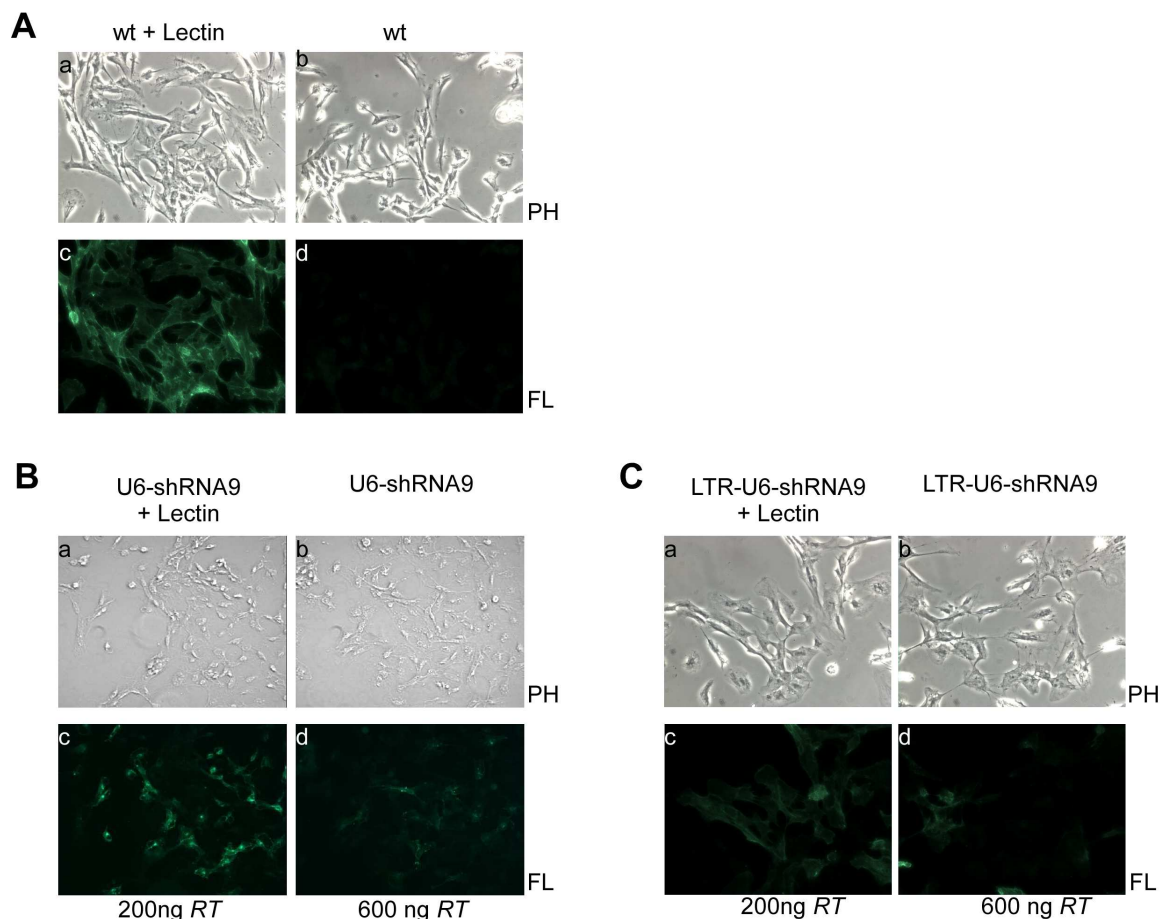


**Abbildung 18**  
**Sulforhodamin B Assay.**

Darstellung der ermittelten PSF Wachstumsraten in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), n=1.

### 3.1.5.2. Mikroskopie transduzierter PSF Mischpopulationen

Zur Visualisierung der Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope auf den Oberflächen der PSF Zellen wurden die transduzierten Zellen (2.9.3.) auf speziellen Mikroskopiernslides kultiviert, mit Lectin gefärbt (2.11.1.) und mikroskopiert (2.11.3.). Gegenüber dem U6-shRNA9 Konstrukt (Abbildung 19B) besaß das LTR-U6-shRNA9 Konstrukt (Abbildung 19C) im Vergleich zu den nicht transduzierten PSF Zellen (Abbildung 19A) auch visuell das stärkere Knockdown Potential der  $\alpha$ gal Epitope. Dies bestätigt die bisherigen Ergebnisse der Analysen der  $\alpha$ GT mRNA level und deutet nicht nur auf die Reduktion der mRNA hin, sondern auch auf die Reduktion des Enzyms auf Proteinlevel, was zur Verringerung der Anzahl der  $\alpha$ gal Epitope führt.



**Abbildung 19**

**Lectinstaining und Mikroskopie von U6-shRNA9 und LTR-U6-shRNA9 transduzierten PSF Zellen mit zwei unterschiedlichen Virusmengen (200ng und 600ng RT).**

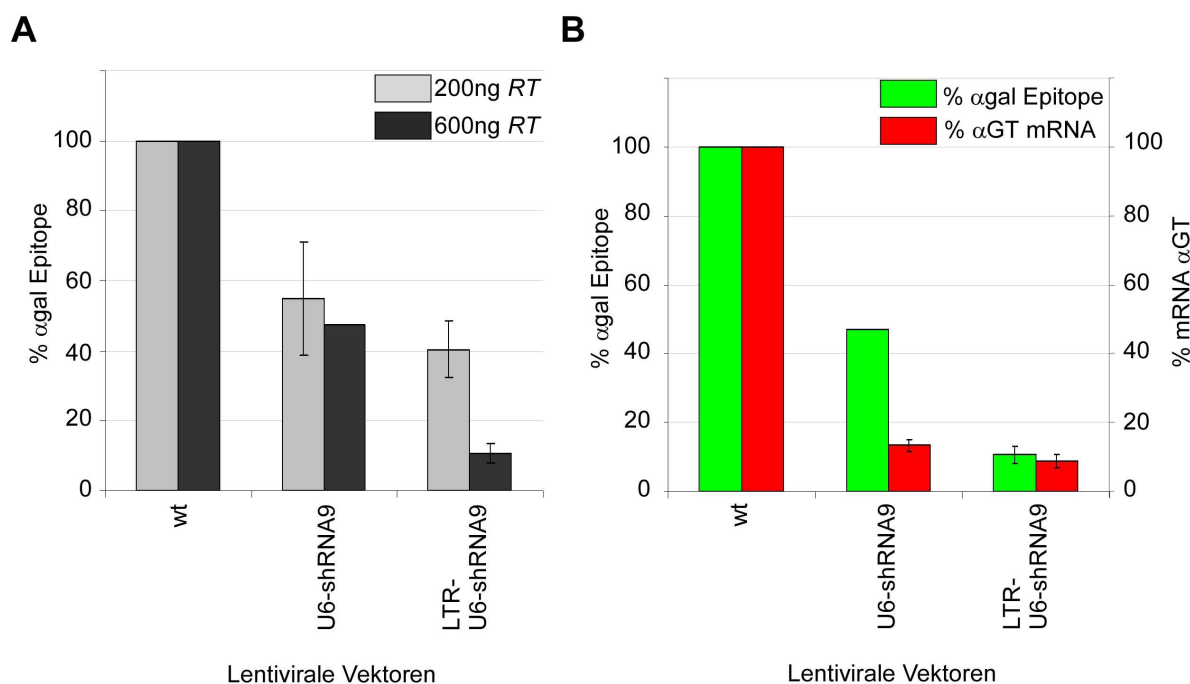
(A) Nicht transduzierte PSF Zellen mit (a, c) und ohne (b, d) Lectinstaining. Vergrößerung 20x, Mikroskopieeinstellungen: Hellfeld/Phasenkontrast (PH): (a-b; 6,76ms Belichtung, 0,2 Sättigung, 1,0 Gamma, 1,0 Gain), Fluoreszenz (FL) nach Lectin Staining (c-d; 10,2s Belichtung, 0,5 Sättigung, 1,0 Gamma, 1,0 Gain). (B) Mikroskopie von transduzierten PSF Zellen mit 200ng und 600ng U6-shRNA9 Virus-RT, Vergrößerung 20x, Mikroskopieeinstellungen siehe 19A (C) Mikroskopie von transduzierten PSF Zellen mit 200ng und 600ng LTR-U6-shRNA9 Virus-RT, Vergrößerung 40x, Mikroskopieeinstellungen siehe 19A.



### 3.1.5.3. Durchflusszytometrie transduzierter PSF Mischpopulationen

Die Quantifizierung der Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope auf den Oberflächen der transduzierten PSF Zellen (2.9.3.) erfolgte nach Lectin-Staining (2.11.1.) per Durchflusszytometrie (2.11.2.) von 20.000 Zellen pro Probe (Abbildung 20).

Durch Infektion mit U6-shRNA9 konnte die Anzahl  $\alpha$ gal Epitope auf  $54,87\% \pm 16,2$  (200ng *RT*) bzw.  $47,20\%$  (600ng *RT*) reduziert werden (Abbildung 20A). Eine weitere Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope wurde durch Infektion mit dem LTR-U6-shRNA9 Konstrukt erzielt ( $40,42\% \pm 8,09$  bei 200ng *RT* und  $10,67\% \pm 2,61$  bei 600ng *RT*) (Abbildung 20A). Bei beiden Konstrukten zeigte sich folglich eine Effizienzverbesserung durch Erhöhung der Virusmenge, insbesondere bei LTR-U6-shRNA9. Interessanterweise zeigten sich bei der Analyse des  $\alpha$ GT mRNA levels nach Transduktion mit 600ng *RT* U6-shRNA9 bzw. LTR-U6-shRNA9 nicht so starke Unterschiede wie bei Analyse der  $\alpha$ gal Epitope: Während eine Reduktion des  $\alpha$ GT mRNA levels auf  $13,41\% \pm 1,82$  (U6-shRNA9) bzw.  $8,74\% \pm 1,88$  (LTR-U6-shRNA9) erreicht wurde (3.1.4.3., siehe auch Abbildung 17C), wurden  $47,20\%$  (U6-shRNA9) bzw.  $10,67\% \pm 2,61$  (LTR-U6-shRNA9)  $\alpha$ gal Epitope detektiert (Abbildung 20B).



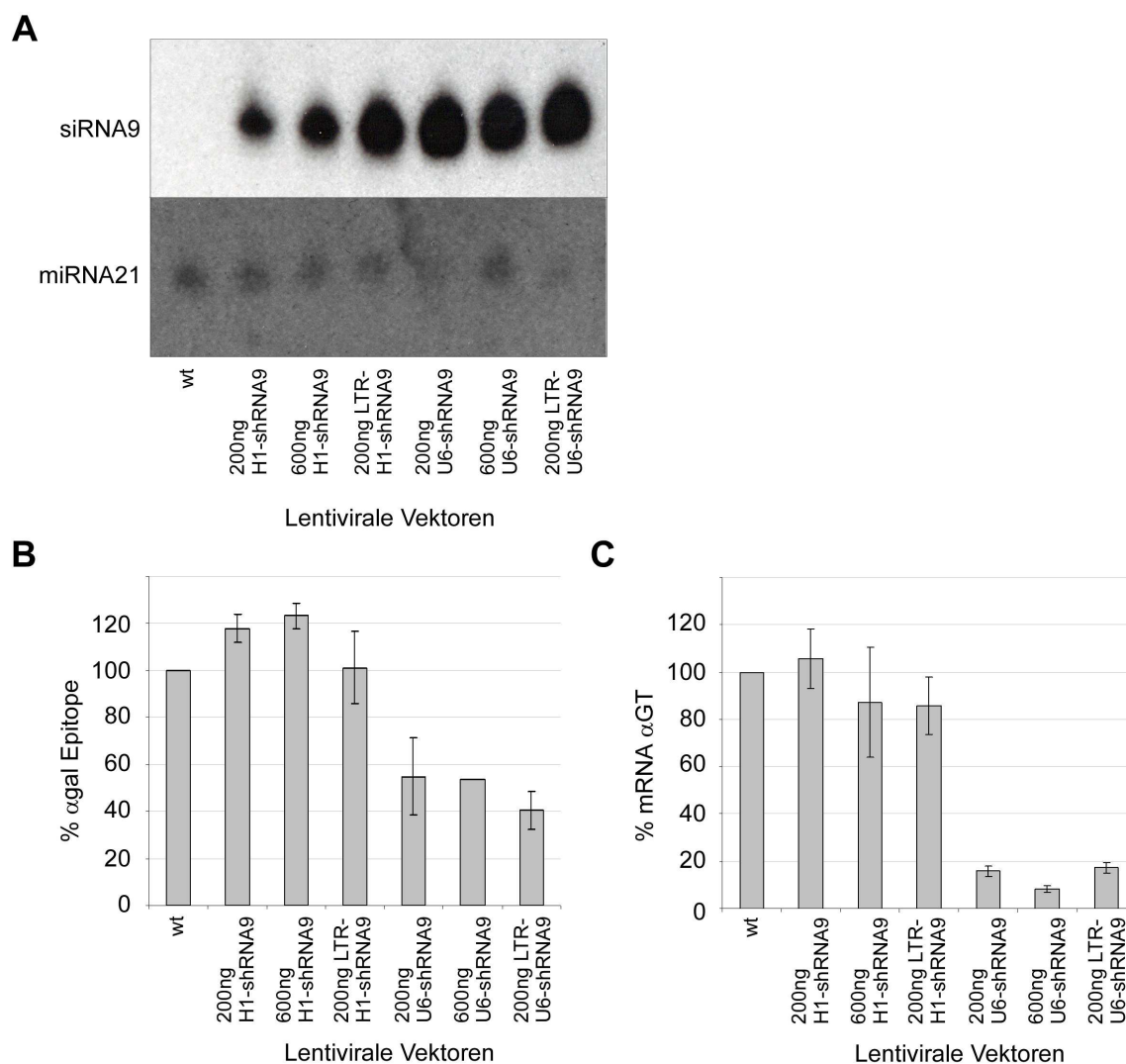
**Abbildung 20**

**Lectinstaining und Durchflusszytometrie von U6-shRNA9 und LTR-U6-shRNA9 transduzierter PSF mit zwei unterschiedlichen Virusmengen (200ng und 600ng *RT*).**

(A)  $\alpha$ gal Epitope in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng bzw. 600ng Virus-*RT*) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), Analyse von 20.000 Zellen nach Lectinstaining,  $n > 3$ , MW  $\pm$  SEM (Ausnahme 600ng U6-shRNA9  $n = 2$ ). (B) Korrelation der  $\alpha$ gal Epitopreduktion (Durchflusszytometrie) mit der  $\alpha$ GT mRNA Reduktion (Real-Time PCR) in % der U6-shRNA9 bzw. LTR-U6-shRNA9 lentiviral transduzierten PSF (600ng Virus-*RT*) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt).

### 3.1.5.4. siRNA Expression in transduzierten PSF Mischpopulationen

Neben den direkten Effekten der shRNA9 auf die  $\alpha$ GT mRNA level (3.1.4.3.) und Expression der  $\alpha$ gal Epitope (3.1.5.2. und 3.1.5.3.) wurde im Folgenden mittels Northern Blot Analyse (2.10.11.) die Menge der gebildeten siRNAs (2.10.2.) in den transduzierten PSF Zellen (2.9.3.) nachgewiesen (Abbildung 21).



**Abbildung 21**

**siRNA9 Expression und funktionelle Analysen der lentiviralen Vektoren mit H1-shRNA9 und U6-shRNA9 Expressionskassetten.**

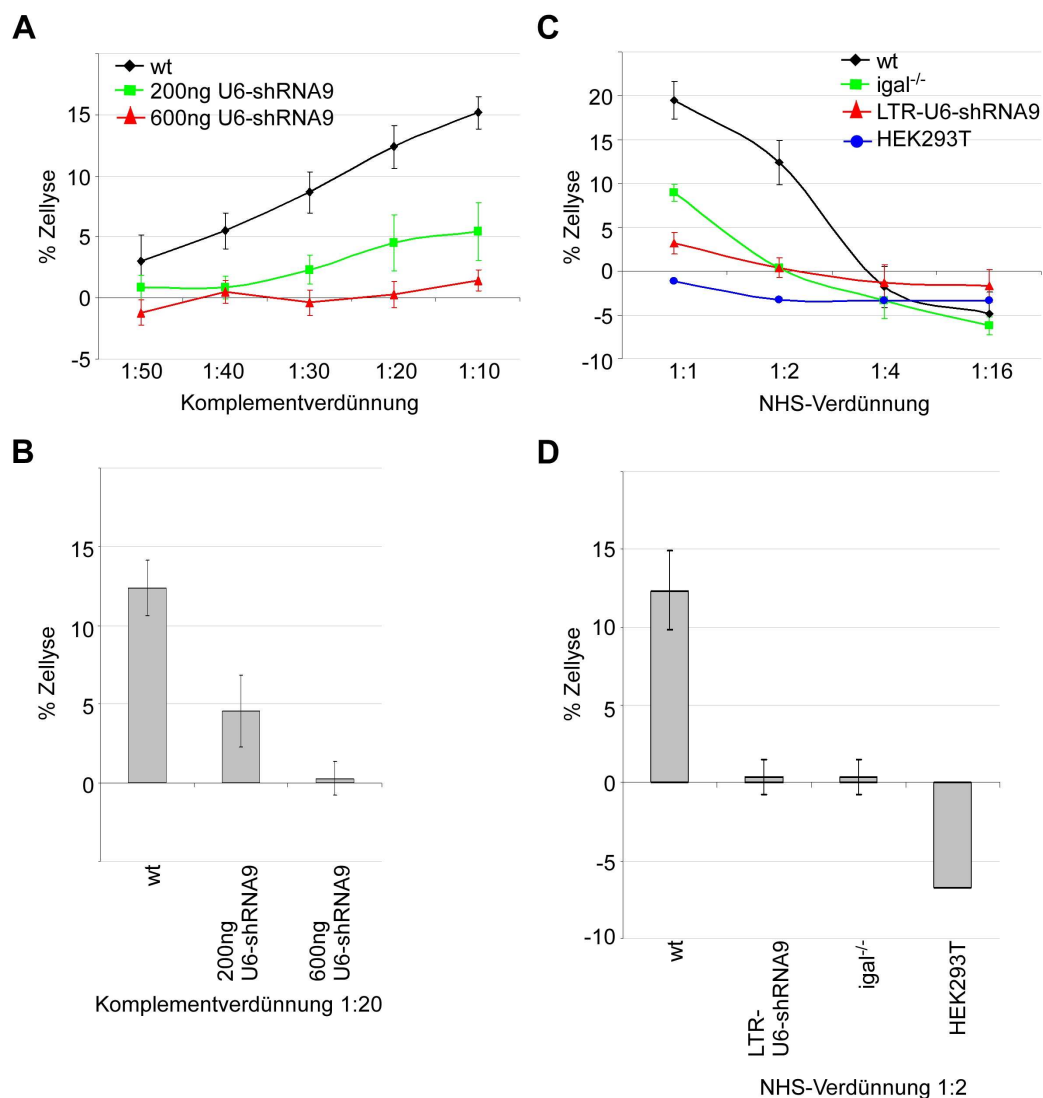
(A) Northern Blot Analyse der siRNA9 gegenüber der Kontroll-siRNA miR-21 nach Transduktion mit verschiedenen lentiviralen Vektoren mit 200ng oder 600ng Virus-RT. (B)  $\alpha$ gal Epitope in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng bzw. 600ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), Durchflusszytometrie von 20.000 Zellen nach Lectinstaining,  $n > 3$ , MW  $\pm$  SEM. (C)  $\alpha$ GT mRNA in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), Real-Time-PCR Analyse,  $n > 3$ , MW  $\pm$  SEM.

Durch die Verwendung der U6-shRNA Expressionskassetten konnten bei allen drei verwendeten lentiviralen Konstrukten (200 bzw. 600ng *RT* U6-shRNA9 sowie LTR-U6-shRNA9) jeweils größere siRNA9 Mengen im Vergleich zu den H1-shRNA9 Konstrukten (200 bzw. 600ng *RT* H1-shRNA9 sowie LTR-H1-shRNA9) erzielt werden (Abbildung 21A). Dementsprechend zeigten auch die Analysen der  $\alpha$ gal Epitope (Abbildung 21B) und der  $\alpha$ GT mRNA (Abbildung 21C) in den transduzierten Zellen mit H1-shRNA Expressionkassetten geringere Reduktionen im Vergleich zu den U6-shRNA Kassetten. Unter Verwendung des U6-Promoters konnte Reduktionen der  $\alpha$ gal Epitope mittels Durchflusszytometrie (2.11.2.) (Abbildung 21B) und der  $\alpha$ GT mRNA mittels Real-Time PCR (2.10.11.) (Abbildung 21C) nachgewiesen werden, welche einher geht mit der höheren siRNA Mengen im Northern Blot (Abbildung 21A). Durch die generell stärkere Expression des U6 Promoters ließen sich im Northern Blot keine visuellen Unterschiede mehr in den siRNA9 Mengen in Abhängigkeit vom Konstrukt im Vergleich zur Loading Kontrolle miR-21 erkennen (Abbildung 21A).

#### 3.1.5.5. Lyse/Chrom-Release Assay

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit ein Knockdown der  $\alpha$ GT und damit einhergehender Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope an der Zelloberfläche die Lyse von porcinen Zellen durch Komplement-haltigem humanen Serum (NHS, Propidiumiodid-Assay) oder aufgereinigtem Komplement (AG Prof. Schwinzer, Chrom-Release Assay) verringert werden kann. Dafür wurden PSF Zellen mit U6-shRNA9 Expressionskassetten transduziert, mit Komplement-haltigen Lösungen inkubiert und die Zelllyse mittels Propidiumiodid-Assay (2.11.5.) oder Chrom-Release-Assay (2.11.6.) analysiert. Dabei konnten in Abhängigkeit von der Stärke der  $\alpha$ gal Epitopreduktionen unterschiedlich hohe Lyseraten festgestellt werden. Der Chrom-Release-Assay zeigte durch Zugabe von aufgereinigtem humanem Komplement im Vergleich zu Wildtyp-PSF Zellen bei den U6-shRNA transduzierten PSF Zellen eine verminderte Zelllyse (Abbildung 22A, grüne Kurve). Die Zelllyse konnte durch Erhöhung der Virusmenge (von 200ng auf 600ng *RT*) zusätzlich reduziert werden (Abbildung 22A, rote Kurve). Nach Infektion der PSF Zellen mit 600ng U6-shRNA9 wurden die Lyse stark reduzierte (Bsp. 1:20 Komplementverdünnung,  $0,3\% \pm 1,06$ , Abbildung 22B). Mittels Propidiumiodid-Assay konnte nach Transduktion mit 200ng *RT* LTR-U6-shRNA9 die Zelllyse durch Zugabe von NHS ebenfalls reduziert werden (Abbildung 22C). Hierbei erreichten die transduzierten PSF Zellen (Bsp. NHS-Verdünnung 1:2 mit  $0,38\% \pm 1,10$ ) gleiche Lysewerte wie die *igal*<sup>-/-</sup> Knockout Zellen ( $0,41\% \pm 1,11$ ), welche durch menschliches

Komplement nicht lysiert werden und als Kontrolle dienten (Abbildung 22D). Auch HEK Zellen zeigen keine durch das Meßverfahren detektierbare Lyse durch Zugabe von NHS. Die hierbei ermittelten negativen Werte wurden jedoch nicht auf Null gesetzt, um den Kurvenverlauf für die Analysen beizubehalten (Abbildung 22C und 22D).



**Abbildung 22**

**Analyse der Zelllyse von U6-shRNA9 und LTR-U6-shRNA9 transduzierten PSF Zellen.**

(A) Zelllyse mittels Komplement (Chrom-Release-Assay, Kooperation mit Prof. Schwinzer, Hannover) in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng bzw. 600ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), n=3, MW ± SEM. (B) Zelllyse nach Chrom-Release-Assay in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng bzw. 600ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), Beispiel Komplementverdünnung 1:20, n=3, MW ± SEM. (C) Zelllyse mittels NHS (Propidiumiodid-Assay) in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), n>3, MW ± SEM (Ausnahme n=2 für HEK293T). (D) Zelllyse nach Propidiumiodid-Assay in % der lentiviral transduzierten PSF (200ng Virus-RT) gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt), Beispiel NHS-Verdünnung 1:2, n>3, MW ± SEM (Ausnahme n=2 für HEK293T).

### 3.1.6. Generierung von Zellklonen

In den bisherigen Versuchen wurden PSF Zellen mit einer definierten Virusmenge *RT* transduziert und sogenannte Mischpopulationen generiert. Die Analysen solcher Mischpopulationen stellten immer nur Mittelwerte aller Zellen der Zellpopulation dar, wobei neben Zellen mit hoher Integrantenzahl auch immer untransduzierte Zellen existieren. Um gezielter die Knockdown Raten transduzierter Zellen untersuchen zu können, wurden aus einem transduzierten Zellpool einzelne Zellklone gewonnen und analysiert (2.10.1.). Diese tragen eine definierte Anzahl Integranten.

#### 3.1.6.1. Bestimmung der Integrantenanzahl in den Zellklonen

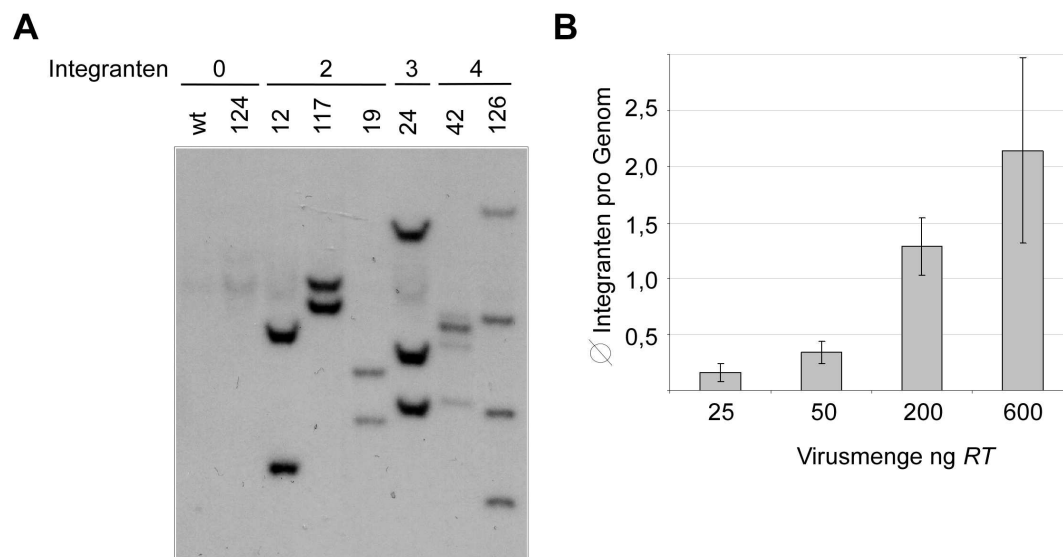
Um in den zu untersuchenden Zellen einen stabilen Knockdown zu gewährleisten, wurden insgesamt 209 Zellklone durch Virustransduktion mit 25-600ng *RT* U6-shRNA9 generiert (2.9.3.), von denen 114 Klone angewachsen sind (2.10.1.) (Tabelle 11). Von den 114 Zellklonen wurde die genomische DNA isoliert (2.10.8.), mit Restriktionsenzymen geschnitten (2.10.9.) und mittels Southern Blot Analyse (2.10.10.) die Anzahl der lentiviralen Virusintegranten untersucht.

**Tabelle 11**  
Statistische Analyse der gewonnenen 209 Zellklone.

	25ng	50ng	200ng	600ng	Summe
generierte Zellklone	56	45	35	73	209
angewachsene Zellklone	44	35	28	7	114
Zellklone mit Integranten	5	10	18	5	38
% Überlebensrate	78,57	77,78	80,00	9,59	
% Zellklone mit Integranten	11,36	28,57	64,29	71,43	
Ø Integrantenzahl pro Zellklon	0,16	0,34	1,29	2,14	

In Abbildung 23A wurden beispielhaft einige Zellklone mit unterschiedlichen Virusintegranten im Southern Blot dargestellt. 38 der 114 Klone trugen zwischen einem und sechs Virusgenomintegranten (Tabelle 16 im Anhang). Von den 38 Klonen trugen 22 Klone einen Virusintegranten, 7 Klone trugen zwei, 4 Klone trugen drei, 4 Klone trugen vier Virusintegranten und ein Klon trug sechs Virusgenomintegranten (Tabelle 16 im Anhang). Dabei war die durchschnittlich erreichte Integrantenanzahl umso höher, je mehr Virusmenge für die Zellklongenerierung verwendet wurde, von Ø 0,16 Integranten bei Verwendung von 25ng Virus-*RT* hin zu Ø 2,14 Integranten bei Verwendung von 600ng Virus-*RT* (Tabelle 11

und Abbildung 23B). Dem Erfolg in der durchschnittlichen höheren Virusintegrantenzahl (2,14) bei hoher verwendeter Virusmenge (600ng RT) stand eine geringe Überlebensrate (9,59%) der generierten Zellklone gegenüber (Tabelle 11).



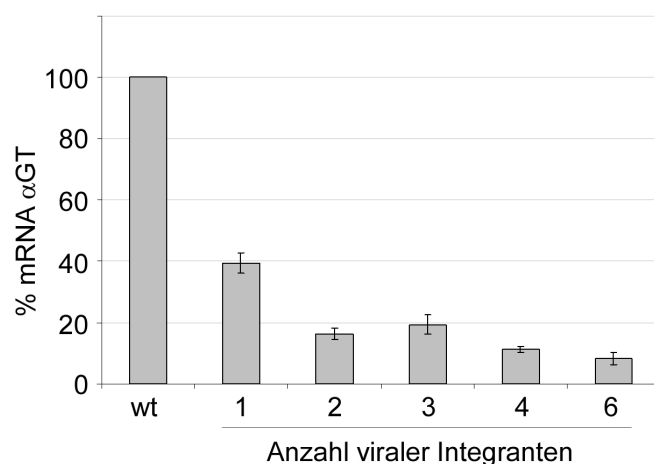
**Abbildung 23**

**Bestimmung der U6-shRNA9 Virusintegranten von Zellklonen.**

(A) Southern Blot Analyse von gewonnenen Zellklonen zur Virusintegrantenbestimmung. Beispiel Blot mit sechs Zellklonen mit 2 bis 4 Virusintegranten. (wt, untransduzierte Kontrolle) (B) Durchschnittliche Integrantenanzahl generierter Zellklone nach Transduktion mit 25ng, 50ng, 200ng und 600ng Virus-RT.

### 3.1.6.2. Analyse der $\alpha$ GT mRNA Expression in den Zellklonen

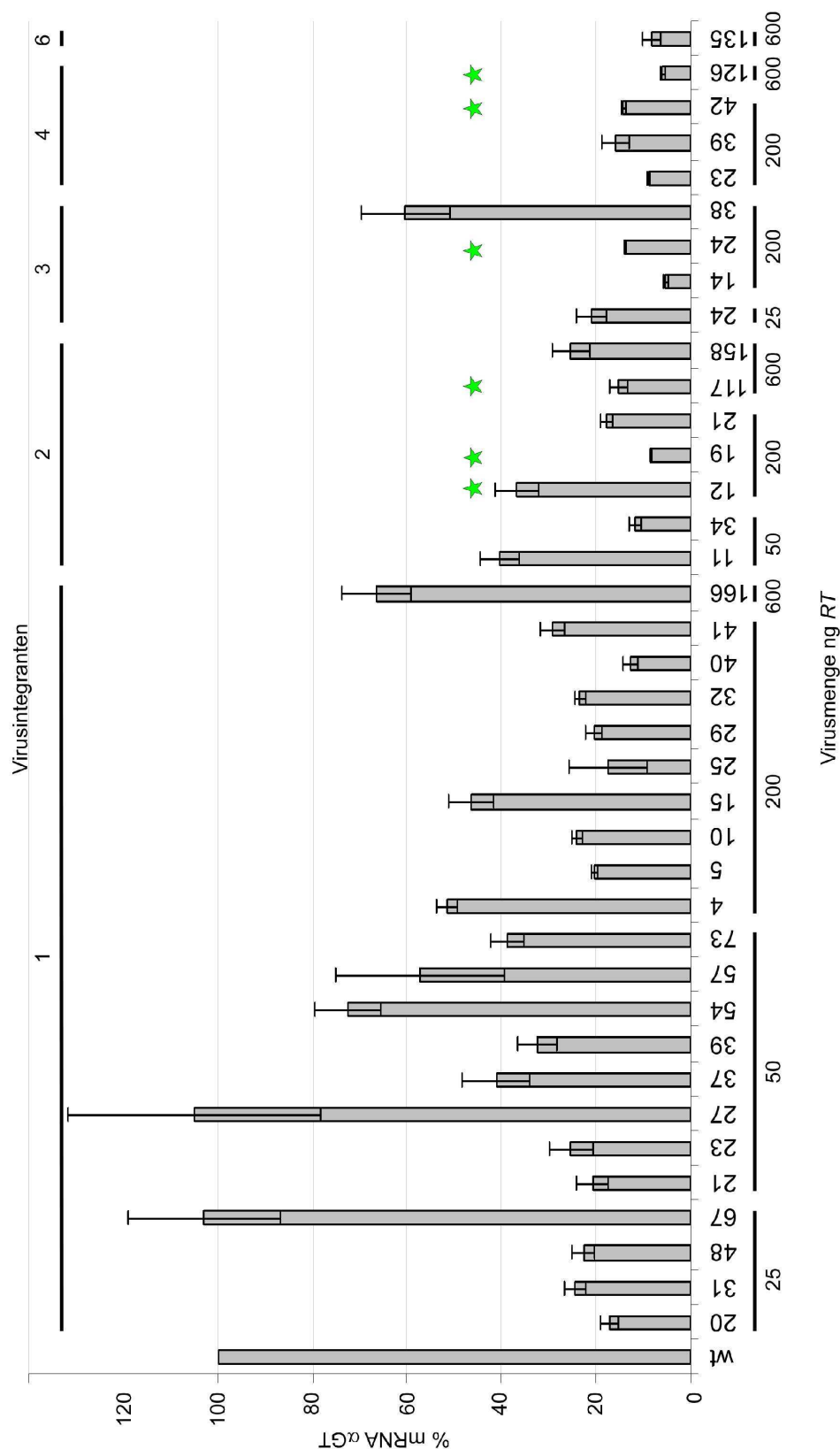
Im Folgenden wurden die Zellklone mittels Real-Time PCR (2.10.4.) hinsichtlich des  $\alpha$ GT mRNA Levels untersucht.



**Abbildung 24**

**Darstellung der Korrelation von Virusintegrantenanzahl der Zellklone und Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA in % im Vergleich zu nicht transduzierten PSF-Zellen (wt).**

Die Analyse der 38 Zellklone, die einen bis sechs Virusintegranten trugen, zeigte dabei eine zunehmende Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA mit zunehmender Virusintegrantenanzahl pro Wirtszellgenom, von durchschnittlich  $39,44\% \pm 3,44$  bei Zellklonen mit einem Virusintegranten, über  $16,36\% \pm 1,74$  bei Zellklonen mit zwei Integranten,  $19,31\% \pm 3,12$  bei Zellklonen mit drei Virusintegranten,  $11,23\% \pm 1,10$  bei Zellklonen mit vier Virusintegranten bis hin zu durchschnittlich  $8,21\% \pm 1,92$  bei Zellklonen mit sechs Integranten (Abbildung 24). Dabei wurden die Zellklone mit gleicher Integrantenanzahl zusammengefasst, unabhängig von der ursprünglich transduzierten Virusmenge (Tabelle 11). In Abbildung 25 wurden die  $\alpha$ GT mRNA Reduktionen aller 38 Zellklone, welche einen bis sechs U6-shRNA9 Virusintegranten tragen, dargestellt (Abbildung 25). Dabei erreichten von den 38 Zellklonen sechs Klone (ca. 16%) eine  $\alpha$ GT mRNA Reduktion auf einen Bereich von 100-50% (Tabelle 16 im Anhang). Zwei Klone hatten eine Erhöhung der  $\alpha$ GT mRNA im Vergleich zu nicht transduzierten PSF Zellen (wt) zur Folge. Acht Klone (ca. 21%) wiesen eine  $\alpha$ GT mRNA Reduktion auf 50-25% auf. Die Mehrzahl der Zellklone (17 Klone, dies entspricht ca. 45%) erreichte eine Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA auf 25-10%. Die stärkste  $\alpha$ GT mRNA Reduktion auf unter 10% konnte durch fünf Klone (ca. 13%) erzielt werden (Tabelle 16 im Anhang). Für weitere Untersuchungen wurde der Fokus auf die in Abbildung 25 markierten Zellklone gelegt und die Zellklone ohne zusätzliche Angabe der ursprünglichen Virusmenge (25, 50, 200 bzw. 600ng RT) aufgeführt.

**Abbildung 25**

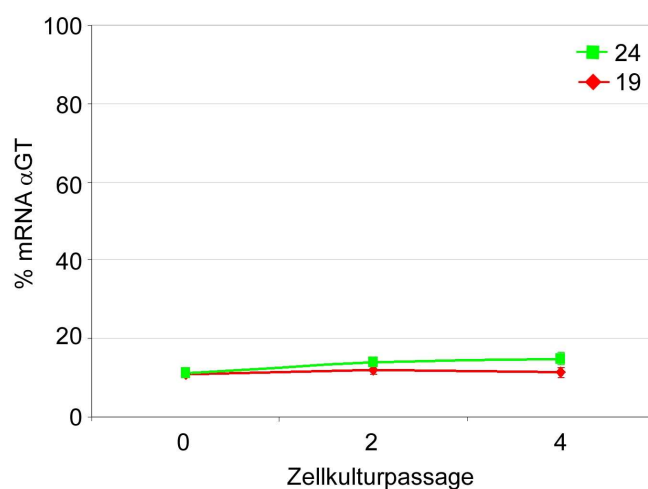
**Analyse der  $\alpha$ GT mRNA level von U6-shRNA9 Zellklonen in % im Vergleich zu nicht transduzierten PSF-Zellen (wt).**

Die Bezeichnungen 25, 50, 200 und 600 bezogen sich auf die Menge RT in ng des verwendeten U6-shRNA9 lentiviralen Konstruktes, die ursprünglich zur Transduktion der PSF Zellen verwendet wurden, aus denen im Folgenden die Zellklone generiert wurden (siehe auch 3.1.6. und 3.1.6.1.).  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  SEM. ★ Wichtige Zellklone nachfolgender Experimente.



### 3.1.6.3. Langzeitanalyse des $\alpha$ GT mRNA Knockdown in den Zellklonen

Durch die Generierung der Zellklone (2.10.1.) konnte jedem Zellklon eine definierte Anzahl an viralen Integranten zugeordnet werden (3.1.6.1.). Dies sollte auch in stabilen Knockdownraten der  $\alpha$ GT mRNA resultieren, was beispielhaft für die Zellklone 19 (zwei Integranten) und 24 (drei Integranten) im Verlauf von vier Zellkulturpassagen (2.8.2.) wiederkehrend mittels Real-Time PCR (2.10.4.) nachgewiesen wurde (Abbildung 26). Selbst nach vier Passagen, was einem Zeitraum von ca. 4 Wochen (Klon 19) bis ca. 5 Wochen (Klon 24) entsprach, blieben die ermittelten  $\alpha$ GT mRNA Level konstant.



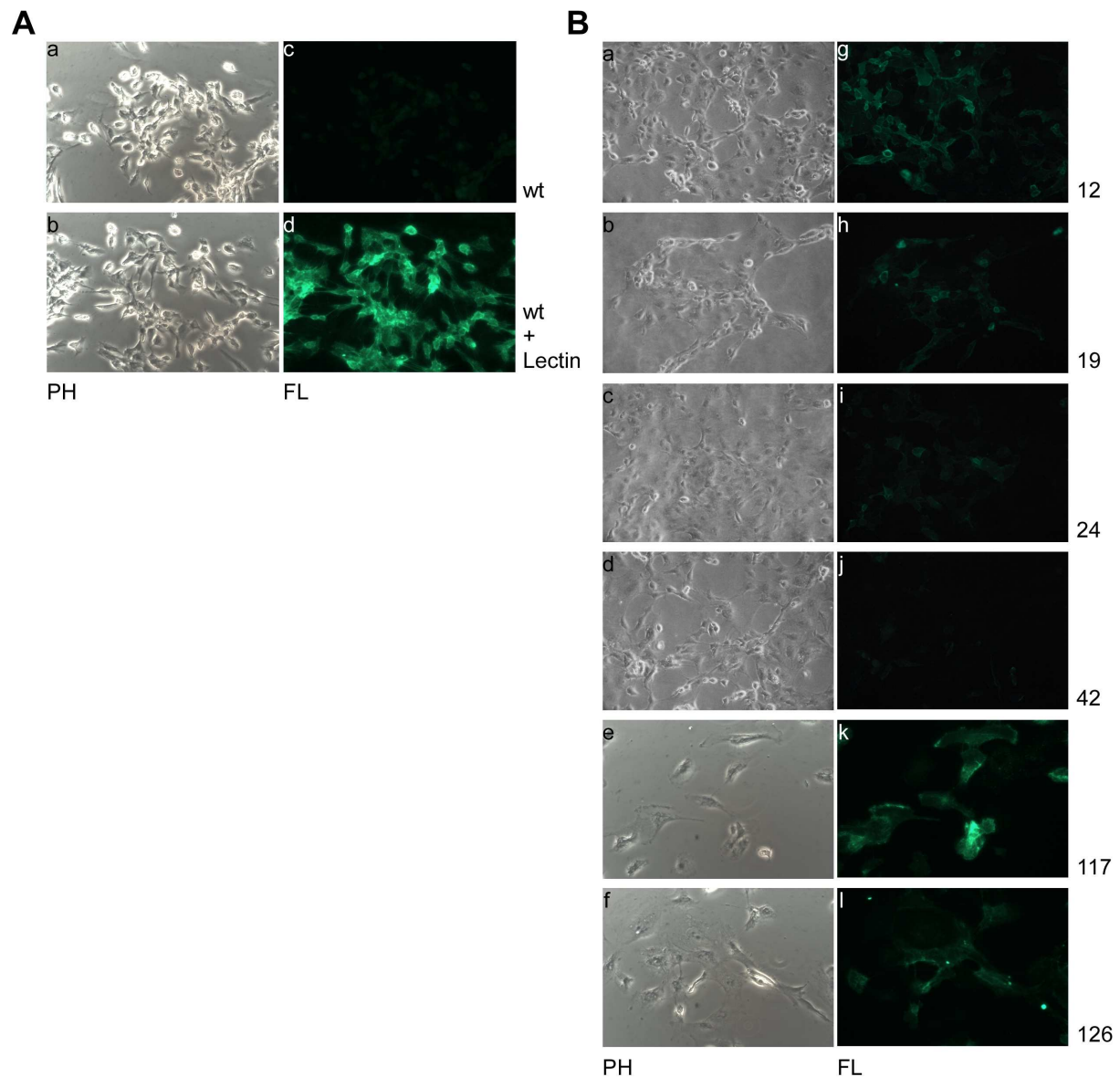
**Abbildung 26**

**Langzeitanalyse der  $\alpha$ GT mRNA der Zellklone 19 und 24.**

Dargestellt ist der Verlauf von 4 Zellkulturpassagen in % gegenüber untransduzierten PSF. n=3, MW  $\pm$  SEM.

### 3.1.6.4. Mikroskopie der Zellklone

Zur Visualisierung der Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope auf den Oberflächen der PSF Zellen wurden die Zellklone (2.10.1.) auf speziellen Mikroskopierslides herangezogen, mit FITC-gelabelten Lectin gefärbt (2.11.1.), welches sich an die  $\alpha$ gal Epitope anlagert, und mikroskopiert (2.11.3.). Dabei zeigte sich, dass je höher die Virusintegrantenzahl der Klone war, umso deutlicher fiel auch die visuelle Ausprägung der  $\alpha$ gal Epitopreduktion unter dem Mikroskop (Abbildung 27B) im Vergleich zu PSF Wildtypzellen aus (Abbildung 27A). Abbildung 27B zeigt diese Korrelation am Beispiel der Zellklone 19 (2 Integranten), 24 (3 Integranten) und 42 (4 Integranten). Obwohl die  $\alpha$ GT mRNA level der Zellklone 117 ( $15,27\% \pm 1,77$ , 2 Integranten) und 126 ( $5,90\% \pm 0,57$ , 4 Integranten) relativ gering ausfielen (Abbildung 25), zeigten sie in der mikroskopischen Analyse höhere Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den Zellklonen 42 ( $14,16\% \pm 0,49$ ) oder 19 ( $8,54\% \pm 0,66$ ) (Abbildung 27B).



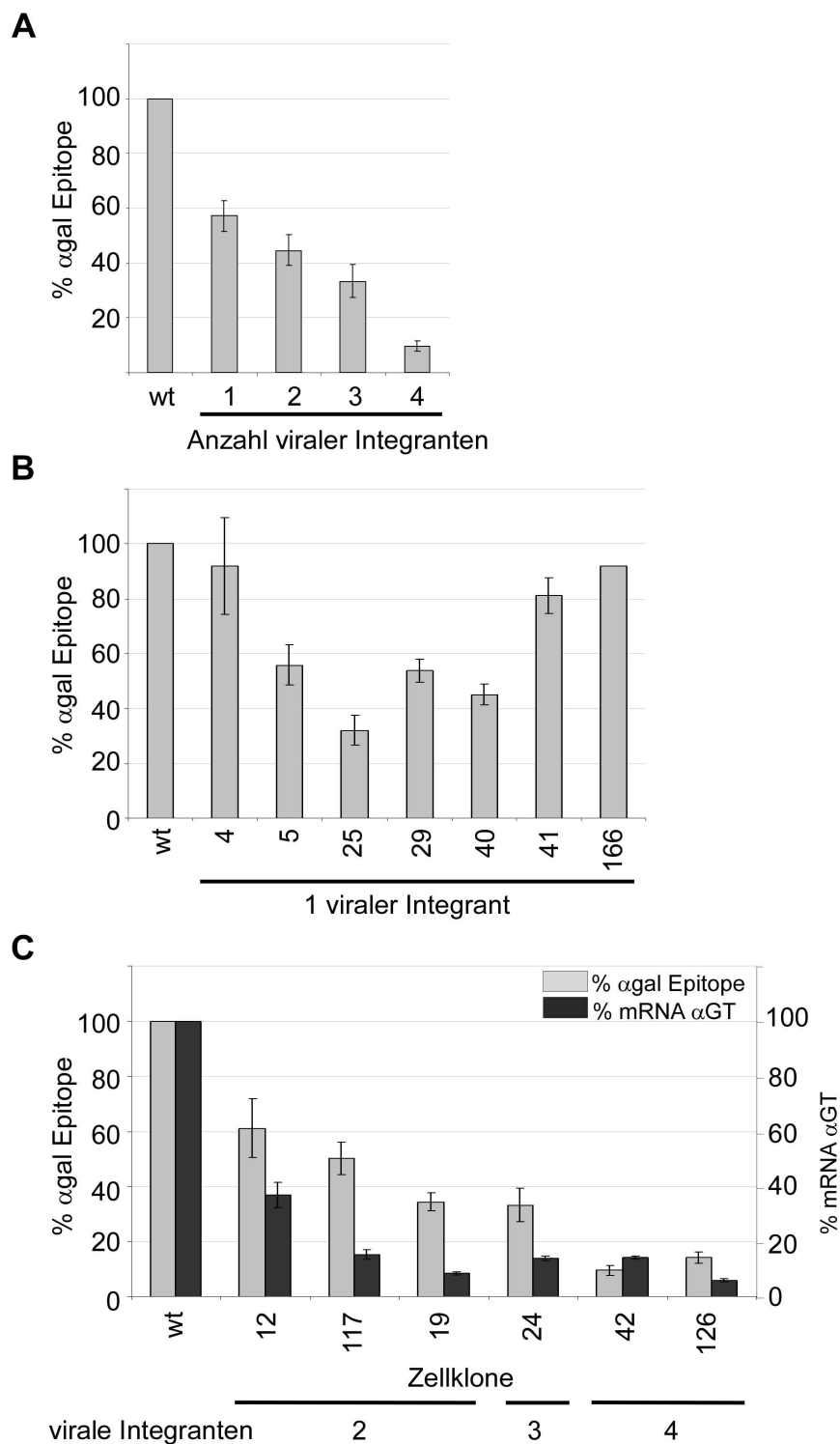
### Abbildung 27

#### Lectinstaining und Mikroskopie von U6-shRNA9 Zellklonen.

(A) Nicht transduzierte PSF Zellen mit (b, d) und ohne (a, c) Lectinstaining. Vergrößerung 20x, Mikroskopieeinstellungen: Hellfeld/Phasenkontrast (PH): (a-b; 6,76ms Belichtung, 0,2 Sättigung, 1,0 Gamma, 1,0 Gain), Fluoreszenz (FL) nach Lectin Staining (c-d; 10,2s Belichtung, 0,5 Sättigung, 1,0 Gamma, 1,0 Gain). (B) Mikroskopie ausgewählter U6-shRNA9 Zellklone; Vergrößerung 20x (a-d) sowie 40x (e-f), Mikroskopieeinstellungen siehe 27A

### 3.1.6.5. Analyse der $\alpha$ gal Epitope der Zellklone

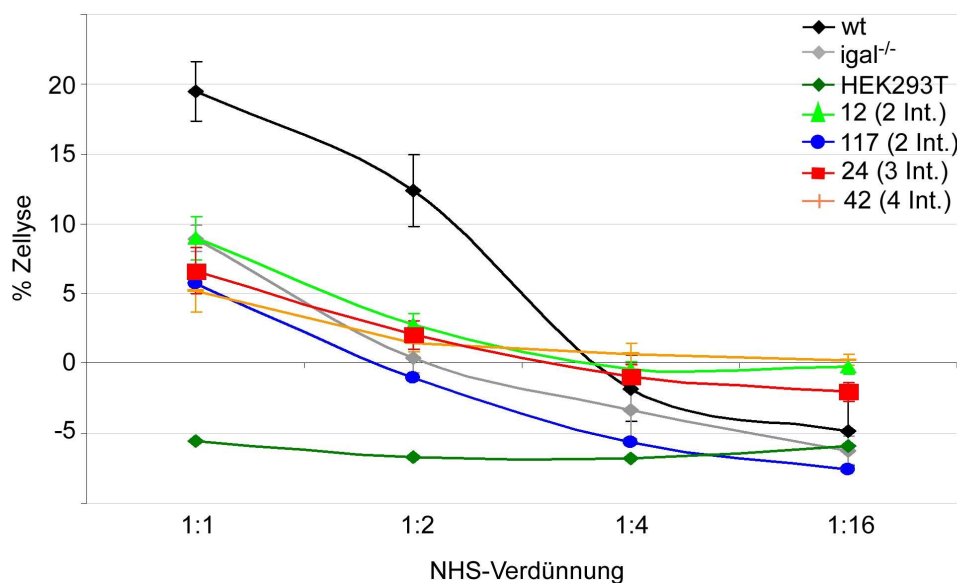
Im Folgenden wurden die U6-shRNA9 Zellklone mittels Lectin Staining (2.11.1.) und Durchflusszytometrie (2.11.2.) hinsichtlich der  $\alpha$ gal Epitoplevel quantitativ untersucht. Die Durchflusszytometrie von 13 ausgewählten Zellklonen mit 1-4 Virusintegranten zeigte eine zunehmende Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope mit zunehmender Virusintegrantenzahl, von durchschnittlich  $58,88\% \pm 5,64$  bei Zellklonen mit einem Virusintegranten bis hin zu durchschnittlich  $10,95\% \pm 1,55$  bei Zellklonen mit vier Virusintegranten (Abbildung 28A). Die  $\alpha$ gal Epitoplevel von Zellklonen mit nur einem Virusintegranten schwankte zwischen  $92,04\% \pm 17,54$  (Klon 4) bis  $32,01\% \pm 5,39$  (Klon 25) (Abbildung 28B, Beispielhafte Darstellung von 7 Zellklonen, Darstellung aller Zellklone mit einem Virusintegranten siehe Abb. 25). In Abbildung 28C wurden die  $\alpha$ gal Epitopreduktionen von ausgewählten Zellklonen mit 2-4 Virusintegranten dargestellt, welche aufgrund ihrer guten Wachstumsraten und hohen Silencingpotentiale (3.1.6.2.) bevorzugt für weitere Untersuchungen herangezogen wurden (Klon 12, 19 und 117 mit zwei Integranten, Klon 24 mit drei Integranten sowie Klon 42 und 126 mit vier Integranten). Die Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope stieg mit zunehmender Integrantenzahl von  $61,13\% \pm 10,57$  (Klon 12) über  $33,33\% \pm 6,03$  (Klon 24) auf  $9,58\% \pm 1,87$  (Klon 42) (Abbildung 28C). In der Abbildung 28C wurden zu Vergleichszwecken die Ergebnisse der Analysen der  $\alpha$ GT mRNA level (Abbildung 25) ausgewählten Zellklone mit den Ergebnissen der Analysen der  $\alpha$ gal Epitope zusammengefasst dargestellt. Das Ausmaß der Reduktion des  $\alpha$ GT mRNA levels und der Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope korrelierten dabei jeweils mit der Anzahl der Virusintegranten: Je mehr Virusintegranten der Zellklon aufwies, umso höher fielen die Reduktionen von  $\alpha$ GT mRNA und  $\alpha$ gal Epitopen aus (Abbildung 28C). Die stärksten  $\alpha$ gal Epitop Knockdown Raten wiesen die beiden Klone mit vier Virusintegranten auf: Klon 42 mit  $9,58\% \pm 1,87$  und Klon 126 mit  $14,14\% \pm 2,02$ . Die hohen  $\alpha$ GT mRNA Knockdown Raten der Klone 19, 24 und 117 (Abbildung 25 bzw. 28C) wirkten sich hingegen nicht auf ähnlich hohe Knockdown Raten der  $\alpha$ gal Epitope aus: Klon 19 mit  $34,38\% \pm 3,21$ , Klon 24 mit  $33,33\% \pm 6,03$  sowie Klon 117 mit  $50,22\% \pm 5,86$  (Abbildung 28C).

**Abbildung 28****Analyse der αgal Epitope und Darstellung des αGT mRNA levels ausgewählter Zellklone.**

(A) Darstellung der Korrelation von Virusintegrantenanzahl der Zellklone mit unterschiedlicher Integrantenanzahl und Reduktion der αgal Epitope in % im Vergleich zu nicht transduzierten PSF-Zellen (wt). (B) αgal Epitope von U6-shRNA9 Zellklonen mit einem Integranten in % im Vergleich zu nicht transduzierten PSF-Zellen (wt),  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  SEM (Ausnahme  $n=2$  für Klon 166). (C) Korrelation der αgal Epitopreduktion (Durchflusszytometrie) mit der αGT mRNA Reduktion (Real-Time PCR) in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt),  $n \geq 3$ , MW  $\pm$  SEM. Daten übernommen aus Abbildung 25.

### 3.1.6.6. Lyse der Zellklone

Die Analyse der Zelllyse erfolgte nach Zugabe von Komplement-haltigen Lösungen (NHS) mittels des Propidiumiodid-Assays (2.11.5.). Dabei ist die Zelllyse umso geringer, je niedriger die Anzahl der  $\alpha$ gal Epitope auf den Zelloberflächen ist. Das Lyseverhalten der Zellklone war bei allen fünf betrachteten Zellklonen ähnlich (Abbildung 29). Bei einer NHS Verdünnung von 1:2 lag die niedrigste Lyse eines Zellklones bei  $-1,03\% \pm 2,77$  (Klon 117). Dies lag zwischen der Zelllyse von  $igal^{-/-}$  Zellen ( $0,41\% \pm 1,11$ ) und HEK Zellen ( $-6,69\%$ ), welche jeweils durch menschliches Komplement nicht lysiert wurden (Abbildung 29).



**Abbildung 29**

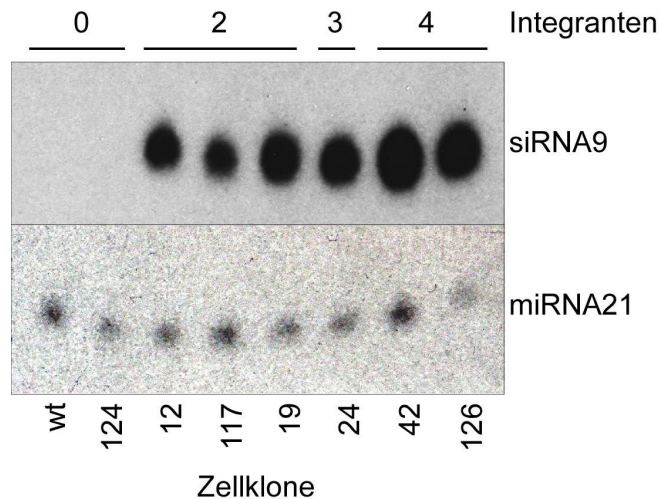
**Untersuchung der Zelllyse von U6-shRNA9 Zellklonen mittels Propidiumiodid-Assay.**

Nach Inkubation der Zellen mit humanem Serum erfolgte die Analyse der Zelllyse, dargestellt sind die Werte in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt),  $n=3$ ,  $MW \pm SEM$  (Ausnahme  $n=2$  für HEK293T).

### 3.1.6.7. siRNA Expression in den Zellklonen

Neben den direkten RNAi-Effekten durch die U6-shRNA9 Expressionskassetten der Zellklone auf die  $\alpha$ GT mRNA (3.1.6.2.) und  $\alpha$ gal Epitope (3.1.6.4. und 3.1.6.5.) wurde anschließend mittels Northern Blot Analyse (2.10.11.) die Menge der gebildeten siRNAs (2.10.2.) nachgewiesen (Abbildung 30). Dabei zeigte sich, dass je mehr Virusintegranten der Zellklon aufwies (3.1.6.1.), umso größere siRNA Mengen waren visuell auch sichtbar (Abbildung 30). Wie schon bei den Mischpopulationen gezeigt wurde (3.1.5.4.), korrelierte die Menge an nachgewiesener siRNA9 mit der Stärke des Knockdown Potentials von  $\alpha$ GT mRNA (Abbildung 25 bzw. 28C) und  $\alpha$ gal Epitope (Abbildung 28). So korrelierten die im Northern Blot (Abbildung 30) sichtbar geringeren siRNA Mengen des Klones 12 (zwei

Virusintegranten) gegenüber den stärker sichtbaren siRNA Mengen des Klonen 42 (vier Virusintegranten) mit den ermittelten  $\alpha$ GT mRNA ( $36,90\% \pm 4,62$  versus  $14,16\% \pm 0,49$ ) und  $\alpha$ gal Epitop Reduktionen ( $61,13\% \pm 10,57$  versus  $9,58\% \pm 1,87$ ).



**Abbildung 30**

**Untersuchung der siRNA9 Expression der Zellklone mittels Northern Blot Analyse.**

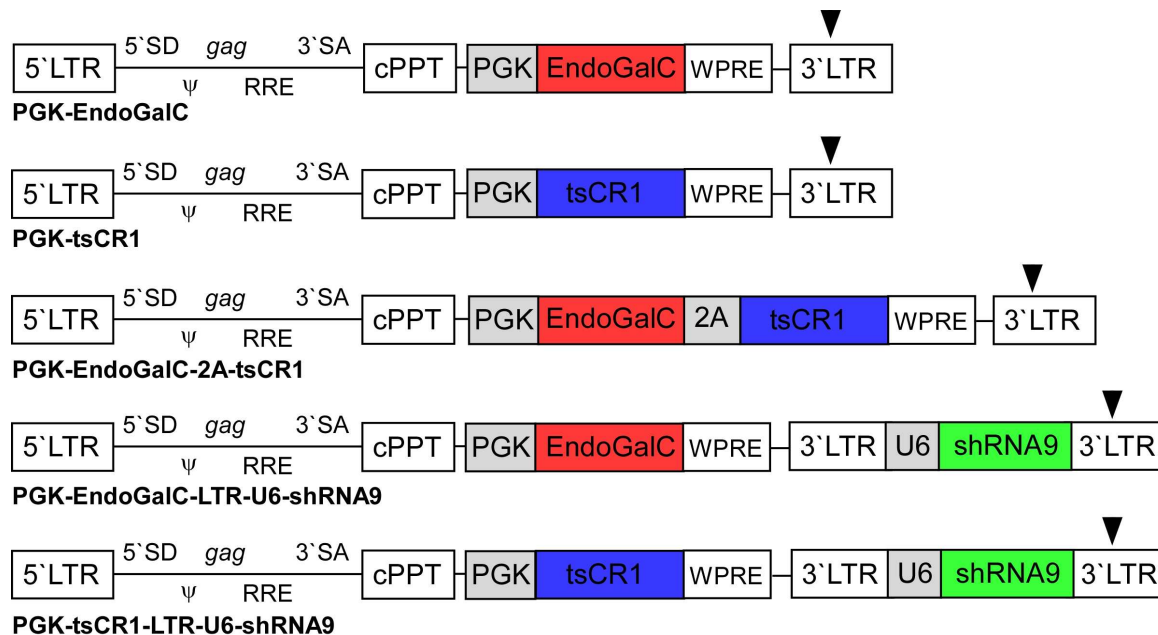
Dargestellt ist die Menge der siRNA9 in den verschiedenen U6-shRNA9 Zellklonen. Als loading-Kontrolle diente miRNA21.

### 3.2. Kombination verschiedener Expressionskassetten im Lentivirus

#### 3.2.1. Generierung multitransgener lentiviraler Vektoren

Neben der U6-shRNA Kassette für den Knockdown der  $\alpha$ GT mRNA sollten im weiteren Verlauf noch weitere Transgene in die lentiviralen Vektoren (LV) kloniert werden (1.6.). Dabei lag der Fokus auf die trunkierte lösliche Version des Complement Rezeptors 1 (tsCR1), ein komplement-regulatorisches Enzym, und auf der Endo- $\beta$ -galactosidase C (EndoGalC), ein Enzym, welches  $\alpha$ gal Epitope auf Schweinezellen reduzieren kann. Beide Proteine sollten letztlich zur geringeren Organabstoßung führen in Hinblick auf die Xenotransplantation porciner Organe. Da die gesamte Virusgenomgröße limitiert ist (ca. 12kb max. mögliche Virus-Genomkapazität, Lu *et al* 2011), wurde eine U6-shRNA Expressionskassette gewählt, welche möglichst eine geringe Größe bei hohem Effekt aufwies (3.1.4.3.). Daher wurden für die nachfolgenden Versuche mit U6-shRNA9 Expressionskassetten im multitransgenen Vektor lentivirale Konstrukte mit der Lokalisation der U6-shRNA9 Kassette in der LTR gewählt. Es wurden unterschiedliche Konstrukte kloniert: (i) Konstrukte mit nur einem Transgen (tsCR1 oder EndoGalC), (ii) Konstrukte mit einem der beiden Transgene und zusätzlich die U6-shRNA9 Expressionskassette in der 3'LTR oder (iii) Konstrukte mit beiden

Transgenen gleichzeitig (tsCR1 und EndoGalC), verbunden über ein 2A Element (Abbildung 31) (2.7.).



**Abbildung 31**

**Schematische Darstellung verschiedener lentiviraler Vektoren.**

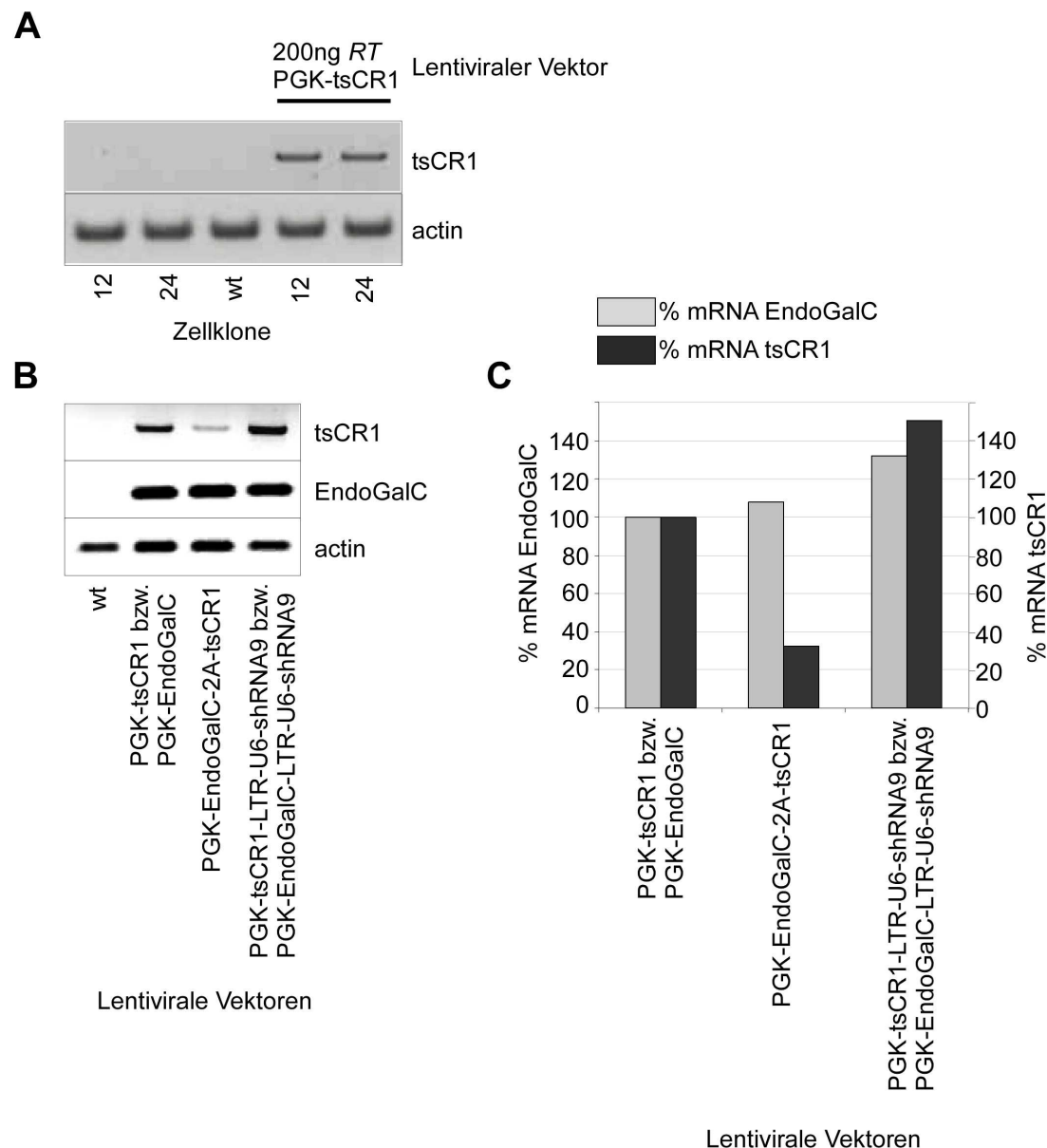
EndoGalC (Endo- $\beta$ -galactosidase C von *Clostridium perfringens*), tsCR1 (trunkierte lösliche Version des Complement Rezeptors 1), 2A Element (22 aa langes Spaltungssignal für das Enzym Furin).

### 3.2.2. Nachweis der Transgenexpression per PCR

Zur Analyse der EndoGalC und tsCR1 Expression in transduzierten Zellen wurde die semiquantitative PCR (2.4.14.) herangezogen. Diese gab erste Hinweise für die Funktionalität der multitransgenen lentiviralen Vektoren (3.2.1.). Nach Transduktion (2.9.3.) von zwei ausgewählten U6-shRNA9 Zellklonen (Klon 12 und Klon 24) mit dem tsCR1 Konstrukt (Abbildung 31, PGK-tsCR1) konnte die tsCR1 mRNA jeweils in den Zellen im Vergleich zu nicht transduzierten PSF Wildtypzellen nachgewiesen werden (Abbildung 32A). Nach Transduktion von PSF Wildtypzellen mit den lentiviralen Konstrukten PGK-EndoGalC, PGK-tsCR1 und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 sowie PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 und PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9 (Abbildung 31) wurden ebenfalls tsCR1 und EndoGalC mRNA Expressionen nachgewiesen (Abbildung 32B). Die Transgenexpressionen von tsCR1 und EndoGalC waren nach Transduktion mit den Einzeltransgenvektoren inklusive der U6-shRNA Kasse (PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 und PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9) mit 131,79% bzw. 150,48% jeweils höher im Vergleich zur Transduktion mit den Einzeltransgenvektoren ohne zusätzliche shRNA (PGK-EndoGalC und PGK-tsCR1) (Abbildung 32B und 32C). Bei Infektion mit dem Doppeltransgen Konstrukt PGK-



EndoGalC-2A-tsCR1 war auffällig, das die EndoGalC mRNA im Vergleich zum Einzelkonstrukt PGK-EndoGalC konstant blieb (107,68%), die tsCR1 mRNA jedoch in geringer Menge (32,44%) nachweisbar war (Abbildung 32B und 32C).



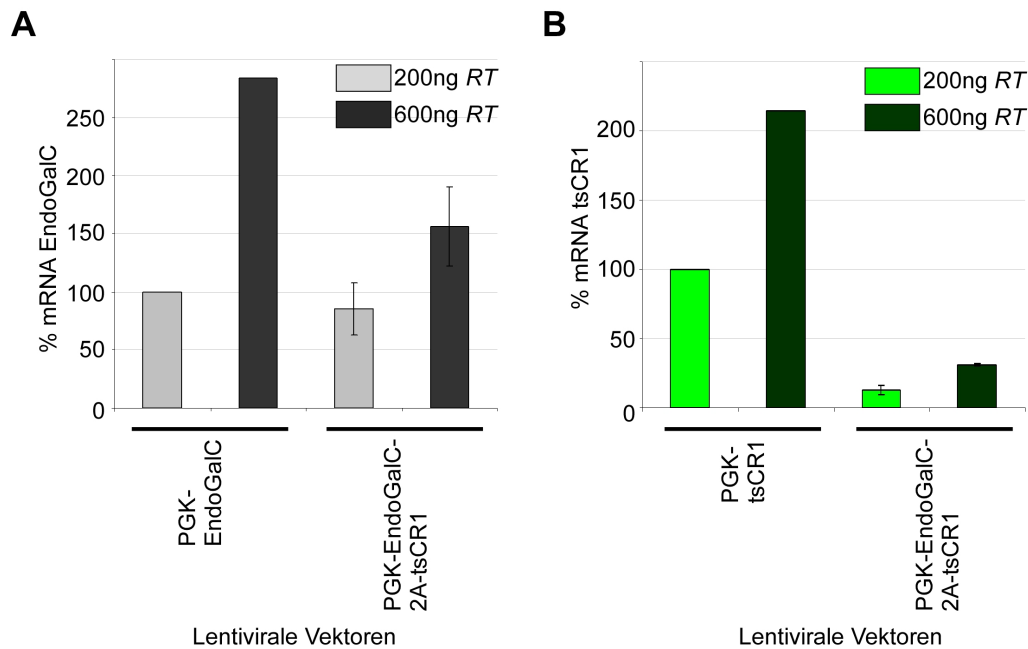
### Abbildung 32

#### Nachweis der Transgenexpression EndoGalC und tsCR1 per Semiquantitativer PCR nach Transduktion mit lentiviralen Konstrukten im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (wt).

(A) Agarosegelelektrophorese nach Semiquantitativer PCR. Transduktion der U6-shRNA9 Zellklone 12 (2 Integranten) und 24 (3 Integranten) mit PGK-tsCR1 im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (wt). tsCR1 und actin Primer sind in Tabelle 20 im Anhang aufgelistet. (B) Agarosegelelektrophorese nach Semiquantitativer PCR nach Transduktion von PSF Zellen mit verschiedenen lentiviralen Vektoren (200ng Virus-RT) im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen (wt). EndoGalC, tsCR1 und actin Primer: Tabelle 20 im Anhang. (C) Grafische Auswertung der EndoGalC und tsCR1 mRNA Expression nach Semiquantitativer PCR in % im Vergleich zu den jeweiligen transduzierten Zellen mit PGK-EndoGalC bzw. PGK-tsCR1. Die Daten wurden aus den Ergebnissen in (B) ermittelt.



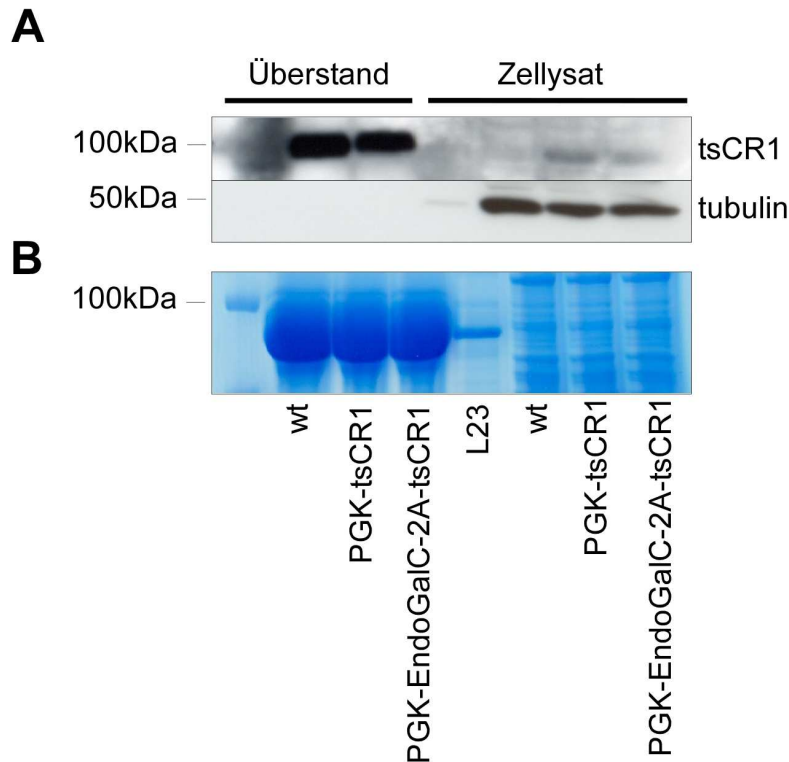
Im Anschluß erfolgte die quantitative Bestimmung der Transgenexpression aller Transgene nach Transduktion der PSF Zellen (2.9.3.) mit den multitransgenen lentiviralen Vektoren (3.2.1.) zeitgleich in einem PCR-Ansatz mittels der SYBR-Green PCR Analyse (2.10.5.). Abbildung 33A zeigt die EndoGalC mRNA Expressionen nach Transduktion mit dem PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Doppeltransgenkonstrukt bzw. dem PGK-EndoGalC Einzelkonstrukt. Dabei war im Vergleich zum Einzelkonstrukt die EndoGalC mRNA Expression des Doppelkonstruktes ähnlich stark ( $85,47\% \pm 22,63$ ). Durch Erhöhung der Virustransduktionsmengen von 200ng auf 600ng *RT* konnten die Expressionen der EndoGalC mRNA gesteigert werden (von 100% auf 283,90% für das PGK-EndoGalC Konstrukt und von  $85,47\% \pm 22,63$  auf  $156,25\% \pm 34,22$  für das PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Konstrukt) (Abbildung 33A). In Abbildung 33B wurden die tsCR1 mRNA Expressionen nach Transduktion vom PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Doppeltransgenkonstrukt mit der Expression nach Transduktion vom tsCR1 Einzelkonstrukt verglichen. Dabei war im Vergleich zum Einzelkonstrukt (200ng *RT*) die tsCR1 Expression des Doppelkonstruktes stark minimiert ( $13,13\% \pm 3,28$ ). Durch Erhöhung der Virustransduktionsmengen von 200ng auf 600ng *RT* PGK-tsCR1 (Einzelkonstrukt) konnten die Expressionen der tsCR1 mRNA von 100% auf 216,64% gesteigert werden (Abbildung 33B). Die Erhöhung der Virustransduktionsmengen konnte die Expression der tsCR1 mRNA für das PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Doppelkonstrukt zwar ebenfalls erhöhen (von  $13,13\% \pm 3,28$  auf  $31,14\% \pm 0,58$ ), blieb damit jedoch weiterhin stark minimiert im Vergleich zur Transduktion mit dem PGK-tsCR1 Einzelkonstrukt (Abbildung 33B). In weiteren nachfolgenden Versuchen wurde geklärt, ob diese Expressionsraten von tsCR1 für einen funktionellen Effekt auf die Reduktion der Zelllyse ausreichend sind, da bisher lediglich Untersuchungen auf mRNA-Level durchgeführt wurden.

**Abbildung 33****Analyse der EndoGalC und tsCR1 mRNA level transduzierter PSF mittels Real-Time PCR Analyse.**

(A) SYBR-Green PCR Analyse nach Transduktion von PSF mit PGK-EndoGalC und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Konstrukten mit 200 und 600ng RT jeweils im Vergleich zur Transduktion mit 200ng RT PGK-EndoGalC. n=3, MW  $\pm$  SEM (Ausnahme n=2 für 600ng RT PGK-EndoGalC). (B) SYBR-Green PCR Analyse von PSF nach Transduktion mit PGK-tsCR1 und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Konstrukten mit 200 und 600ng RT jeweils im Vergleich zur Transduktion mit 200ng RT PGK-tsCR1. n=3, MW  $\pm$  SEM (Ausnahme n=2 für 600ng RT PGK-tsCR1).

### 3.2.3. Nachweis des tsCR1 Proteins

Wie schon vorangegangen erwähnt sollte im Folgenden geprüft werden, ob die auf mRNA level nachgewiesene Expression von tsCR1 in transduzierten PSF Zellen (3.2.2.) für eine ausreichende Funktionalität des Enzyms ausreicht. Das tsCR1 Protein wird nach Bildung von den Zellen sezerniert und kann mittels Western Blot Analyse (2.10.12.) untersucht werden. Nach Infektion von PSF Zellen mit den Konstrukten PGK-tsCR1 und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 konnte das tsCR1 Protein sowohl im Zelllysate als auch im Zellüberstand (Abbildung 34A und 34B) nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Sezernierung des gebildeten tsCR1 Proteins in nachweisbaren Mengen.

**Abbildung 34**

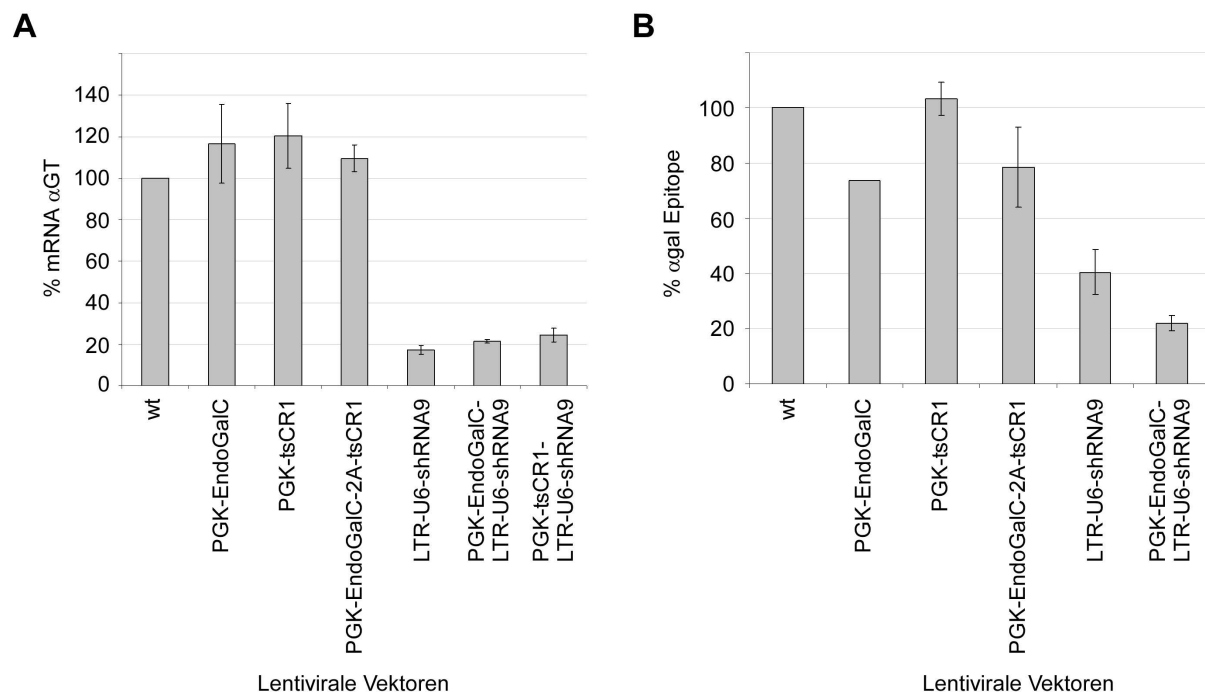
**Western Blot Analyse vom tsCR1 Protein in Zellysat und Zellüberstand transduzierter PSF Zellen.**

(A) Western Blot Analyse von tsCR1 und der Loading Kontrolle Tubulin nach Transduktion von PSF Zellen mit den Konstrukten PGK-tsCR1 und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 im Vergleich zu nicht transduzierten PSF (wt) und L23 Kontrollzellen. (B) Coomassie Gelstaining als Loadingkontrolle der aufgetragenen Proteine im Überstand.

### 3.2.4. Funktionelle Analysen der Einzel- und Doppeltransgen Vektoren

Desweiteren wurde analysiert, ob die gebildeten EndoGalC mRNA Mengen ebenfalls ausreichend waren, um eine Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope detektieren zu können und dadurch eine Minimierung der Zelllyse nach sich ziehen. Gebildete tsCR1 Proteinmengen dienen ebenso der Reduktion der Zelllyse und wurden dahingehend auf Funktionalität untersucht. Hierzu wurden die mit den lentiviralen Vektoren (3.2.1.) transduzierten Zellen (2.9.3.) auf die  $\alpha$ gal Epitopellevel (2.11.2.) und das Zelllyseverhalten nach Propidiumiodid Assay (2.11.5.) analysiert und verglichen. Per Real-Time PCR (2.10.4.) erfolgte zusätzlich ein genereller Vergleich der multitransgenen Vektoren mit den LTR-U6-shRNA9 Vektorkonstrukten hinsichtlich der  $\alpha$ GT mRNA Reduktion. In Abbildung 35A wurden die Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA durch Infektion von PSF Zellen mit den verschiedenen lentiviralen Vektoren (3.2.1.) dargestellt. Da nur die shRNA9 einen direkten Einfluß auf das  $\alpha$ GT mRNA Level hat, wurde erwartungsgemäß nur nach Infektion mit diesen Konstrukten eine  $\alpha$ GT mRNA Reduktion messbar (LTR-U6-shRNA9 auf  $17,24\% \pm 2,05$ , PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 auf  $21,33\% \pm 0,93$  sowie PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9 auf  $24,34\% \pm 3,21$  gegenüber Wildtyp-

Level) (Abbildung 35A). Dabei zeigte erwartungsgemäß die zusätzliche Klonierung der Transgene EndoGalC oder tsCR1 in den LTR-U6-shRNA9 Vektor keine Änderung der  $\alpha$ GT mRNA Level, sie waren bei allen drei Konstrukten ähnlich stark reduziert. Die Konstrukte PGK-tsCR1 ( $120,31\% \pm 15,72$ ), PGK-EndoGalC ( $116,58\% \pm 19,03$ ) und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 ( $109,48\% \pm 6,42$ ) hatten wie erwartet und wie oben bereits erwähnt keinen Effekt auf die  $\alpha$ GT mRNA Level (Abbildung 35A). Die Funktionalität der lentiviralen Vektoren mit dem Transgen EndoGalC auf die  $\alpha$ gal Epitope wurde in Abbildung 35B dargestellt: Die Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope wird dabei sowohl durch shRNA9 Expression als auch durch die EndoGalC Expression beeinflusst. Die  $\alpha$ gal Epitop Reduktion durch das Konstrukt LTR-U6-shRNA9 (auf  $40,42\% \pm 8,09$  gegenüber wt) konnte durch Kombination mit der PGK-EndoGalC Expressionskassette mit dem Konstrukt PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 ( $21,94\% \pm 2,71$ ) weiter verstärkt werden (Abbildung 35B). Die beiden Konstrukte ohne shRNA (PGK-EndoGalC und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1) wiesen ähnlich starke  $\alpha$ gal Epitopreduktionen auf ( $73,55\%$  und  $78,52\% \pm 14,56$ , Abbildung 35B). PGK-tsCR1 selbst ( $103,28\% \pm 6,03$ ) hatte wie erwartet keinen Einfluß auf die Abundanz der  $\alpha$ gal Epitope (Abbildung 35B).

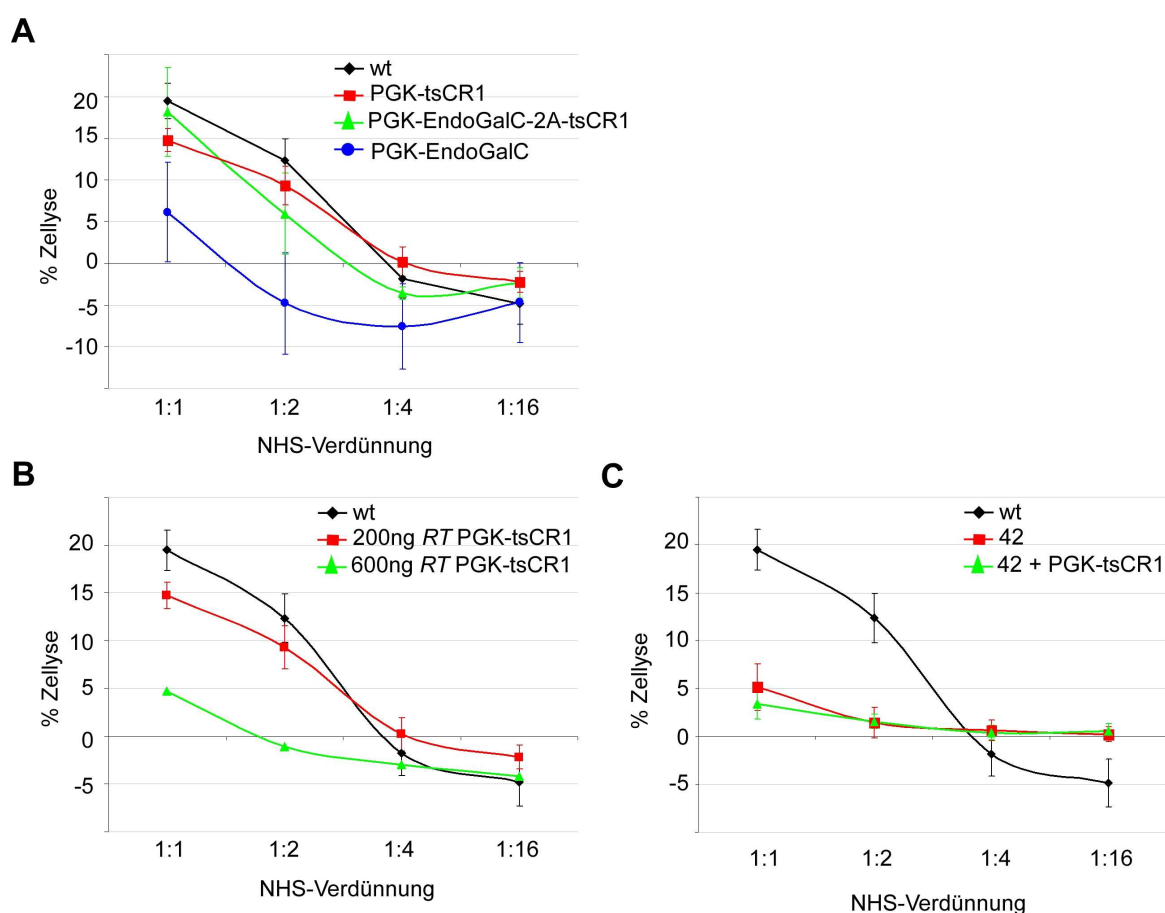


**Abbildung 35**

**Analyse der  $\alpha$ GT mRNA und  $\alpha$ gal Epitope nach Transduktion von PSF mit verschiedenen multitransgenen lentiviralen Vektoren.**

(A)  $\alpha$ GT mRNA Level verschiedener Vektoren in % nach Transduktion von PSF im Vergleich zu nicht transduzierten PSF (wt). n=3, MW  $\pm$  SEM. (B)  $\alpha$ gal Epitop Level verschiedener Vektoren in % nach Transduktion von PSF Zellen im Vergleich zu nicht transduzierten PSF (wt). n=3, MW  $\pm$  SEM, Ausnahme PGK-EndoGalC mit n=2.

Die nachgewiesenen  $\alpha$ gal Epitop Reduktionen wurden anschließend auf das Lyseverhalten der Zellen und damit auf die Funktionalität hin untersucht. Nach Transduktion der PSF Zellen mit den Konstrukten PGK-EndoGalC, PGK-tsCR1 und PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 wies das PGK-EndoGalC Konstrukt die geringste Zelllyse im Vergleich zu nicht transduzierten Zellen auf (Abbildung 36A). Die Zelllyse des PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Konstruktes ( $5,93\% \pm 4,88$ ) lag dabei zwischen der des PGK-EndoGalC ( $-4,79\% \pm 6,07$ ) und des PGK-tsCR1 Konstruktes ( $9,33\% \pm 2,28$ ). Die Reduktion der Zelllyse durch das tsCR1 Konstrukt konnte durch Erhöhung der transduzierten Virusmenge von 200ng auf 600ng *RT* verstärkt werden (beispielhaft für die NHS-Verdünnung 1:2 von  $9,33\% \pm 2,28$  auf  $-1,04\%$ ) (Abbildung 36B).



**Abbildung 36**

**Analyse der Zelllyse von PSF Zellen nach Transduktion mit verschiedenen Viruskonstrukten mittels Propidiumiodid-Assay.**

(A) Zelllyse von PSF Zellen nach Transduktion mit 200ng *RT* Viruskonstrukten in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt). n=3, MW  $\pm$  SEM. (B) Zelllyse von PSF Zellen nach Transduktion mit 200ng und 600ng *RT* PGK-tsCR1 Viruskonstrukt in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt). n=3, MW  $\pm$  SEM. (Ausnahme für 600ng PGK-tsCR1 mit n=1). (C) Zelllyse vom Zellklon 42 nach Transduktion mit 200ng *RT* PGK-tsCR1 in % gegenüber nicht infizierten PSF Zellen (wt). n=3, MW  $\pm$  SEM.

In einem zusätzlichen Versuch wurde der Zellklon 42 (drei U6-shRNA9 Virusintegranten) mit dem PGK-tsCR1 Konstrukt transduziert und die Zelllyse analysiert. Die zusätzliche

Infektion zeigte dabei nur bei der höchsten Serummenge eine weitere Minimierung der Zelllyse (Abbildung 36C). Der hauptsächliche Effekt rührt daher von der U6-shRNA9 Transgenkassette.

### 3.3. Generierung Transgener Schweine

Die vorangegangenen beschriebenen Klonierungen lentiviraler Vektoren mit U6-shRNA (3.1.4.3.) sowie weiteren Transgenen wie EndoGalC oder tsCR1 (3.2.1.) dienten dazu, Konstrukte zu finden, die am effizientesten die  $\alpha$ GTmRNA level und  $\alpha$ gal Epitope an der Zelloberfläche reduzieren und die Zelllyse porciner Zellen durch humanes Serum am stärksten verhindern. Diese lentiviralen Vektoren wurden anschließend für die Generierung transgener Schweine in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wolf (Lehrstuhl für molekulare Tierzucht und Biotechnologie, München) verwendet.

#### 3.3.1. Generierung und Geburt von Schweinen

Transgene Schweine wurden über zwei Methoden generiert: (i) über subzonale Virusinjektion in den perivitellinen Raum einer befruchteten Eizelle im Einzellstadium mit anschließendem Embryonaltransfer (ET) und (ii) über Virustransduktion (2.9.3.) von PSF Zellen mit anschließendem Nukleustransfer (NT) in entkernte Eizellen und nachfolgendem Embryonaltransfer (2.12.). Dies erfolgte in einem Zeitraum von März 2006 bis Februar 2009 (Tabelle 17 und Tabelle 18 im Anhang). Insgesamt wurden 20 Embryonaltransfers nach subzonomer Virusinjektion durchgeführt, von denen sechs in einer Trächtigkeit resultierten und davon fünf erfolgreich beendet werden konnten (Tabelle 12). Dies entsprach einer Trächtigkeitserfolgsrate dieser Methode von 25%, wobei 18 der 27 geborenen Ferkel lebend geboren wurden (Tabelle 12). Aus den sieben durchgeführten Nukleustransferen resultierten fünf Trächtigkeiten, von denen bei zwei eine Resorption der Embryonen stattfand, zwei gezielt vorzeitig für die Analyse abgebrochen und eine vollständig ausgetragen wurde (Tabelle 13). Insgesamt wurden dabei 10 Tiere geboren, von denen vier lebend geboren wurden und sechs Feten (F1-F6) wegen frühzeitigen Abbruchs tot geholt wurden (Tabelle 13).

Tabelle 12

Auflistung der fünf erfolgreich beendeten Trächtigkeiten mittels Subzonaler Virusinjektion und anschließendem Embryonaltransfer.

Lentivirales Konstrukt	Datum Subzonale Injektion	Mutter	Geburt	Anzahl Ferkel	Nummer Ferkel	Anzahl Ferkel lebend nach Geburt	% Ferkel lebend nach Geburt
U6-shRNA9	26.06.2006	446	15.10.2006	7	9536-9542	5	71,4
PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	28.01.2008	478	19.05.2008	4	9687-9690	2	50
PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	28.01.2008	479	19.05.2008	5	9691-9695	4	80
LTR-U6-shRNA9	25.02.2008	481	17.06.2008	9	9696-9704	5	55,6
PGK-EndoGalC-2A-tsCR1	22.09.2008	484	16.01.2009	2	9795-9796	2	100
				27	Summe	18	

Tabelle 13

Auflistung der drei erfolgreichen Trächtigkeiten mittels Virustransduktion, anschließendem Kerntransfer und Embryonaltransfer.

Lentivirales Konstrukt	Datum ET	Mutter	Geburt	Anzahl Ferkel	Nummer Ferkel bzw. Feten	Anzahl Ferkel lebend nach Geburt	% Ferkel lebend nach Geburt
PGK-EndoGalC-2A-tsCR1	07.11.2008	NT28	03.03.2009	4	9832-9835	4*	100*
PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	13.02.2009	n.d.	06.04.2009#	2	F1-F2		
PGK-EndoGalC-LTR-H1-shRNA9	20.03.2009	NT 47	08.06.2009#	4	F3-F6		
			Summe	10			

\* Ein lebend geborenes Ferkel wurde am Tag 2 nach Geburt von der Mutter erdrückt. # Die Trächtigkeiten wurden gezielt vorzeitig abgebrochen und die Föten tot geholt.

Die Ferkel wurden nach der Geburt unter natürlichen Bedingungen in speziellen Aufzuchtgehegen bei der Mutter gehalten und durch diese ernährt (Abbildung 37).



Abbildung 37

Beispiel der Aufzuchtgehege mit Muttertier und vier Ferkeln.

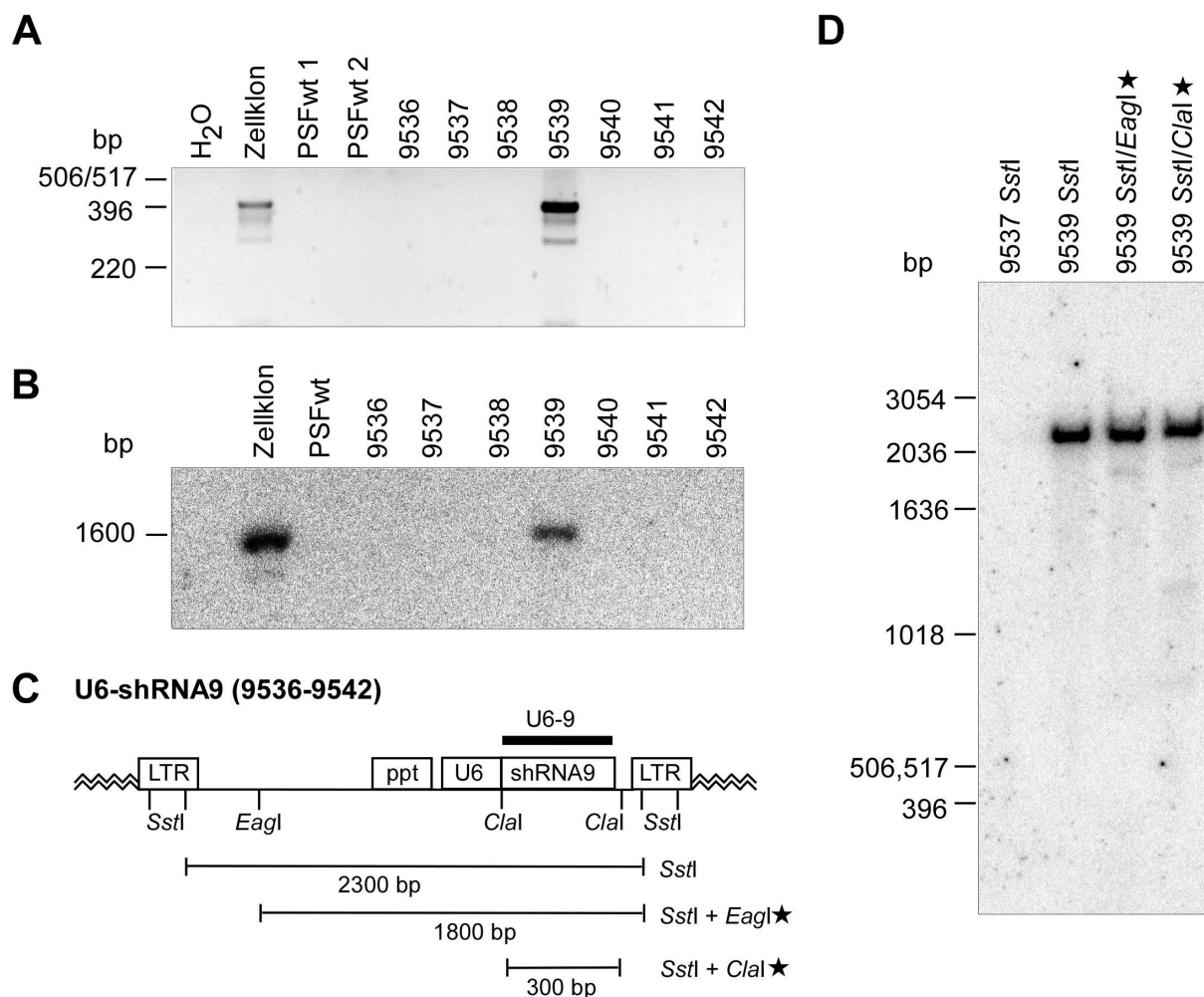
### 3.3.2. Analyse der Integranten und Methylierungen

Die genomische DNA (2.12.1.) aller 27 Ferkel aus der Methode der subzonalen Virusinjektion (2.12.) und aller 10 Ferkel aus der Methode des Nukleustransferes (2.12.) wurden entsprechend der Reihenfolge der Würfe (Tabelle 12 und 13) auf das Vorhandensein lentiviraler Integranten mittels Southern Blot Analyse (2.10.10.) hin untersucht. Die Isolation der RNA (2.10.2.), gefolgt von cDNA Synthese (2.10.3.) und semiquantitativer PCR (2.4.14.) diente als erste Einschätzung, ob transgene Ferkel im Wurf vorhanden waren.

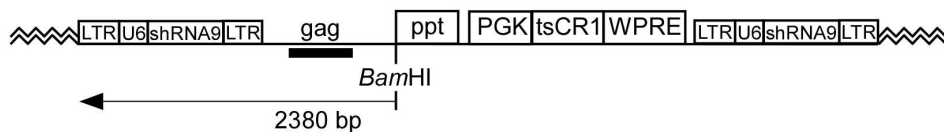
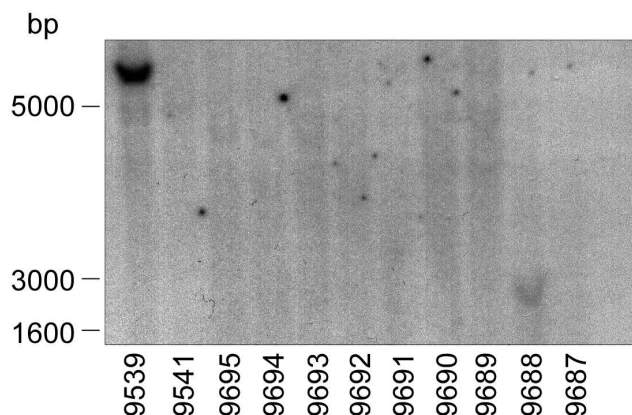
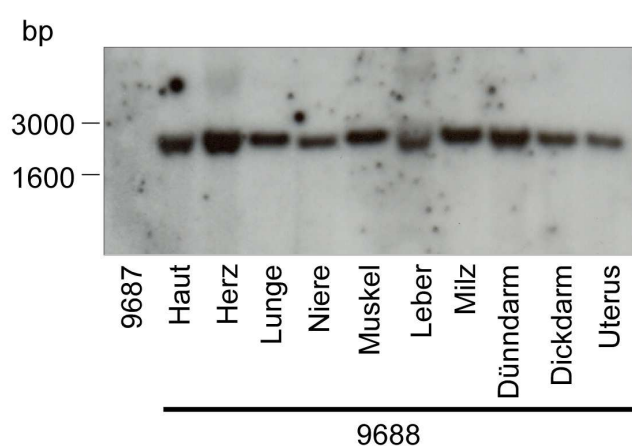
Nach subzonaler Injektion des Virus U6-shRNA9 am 26. Juni 2006 konnten nachfolgend 38 Embryonen erfolgreich in das Muttertier 446 transferiert werden. Am 15. Oktober 2006 wurden sieben Ferkel geboren (9536-9542), von denen zwei die Geburt nicht überlebten (9538 und 9542). Die PCR Analyse der cDNA zeigte, dass das lebend geborene Ferkel 9539 transgen war. (Abbildung 38A). Die Southern Blot Analyse der gDNA unter Verwendung der U6-shRNA9-Sonde (Tabelle 19 im Anhang) ergab für das Ferkel 9539 einen Virusintegranten (Abbildung 38B). Die Analyse mit nicht methylierungssensitiven Enzymen (*SstI*) sowie methylierungssensitiven Enzymen (*EagI* und *ClaI*) (Abbildung 38C) und nachfolgendem Southern Blot ließ jedoch aufgrund der identischen Bandenmuster (Abbildung 38D) auf eine Methylierung des integrierten Virusgenoms und damit auf eine transkriptionelle Inaktivität schließen. Alle Ferkel dieses Wurfs wurden daraufhin getötet.

Nach subzonaler Injektion des Virus PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9 am 28. Januar 2008 konnten nachfolgend 65 Embryonen erfolgreich in das Muttertier 478 transferiert werden. Am 19. Mai 2008 wurden vier Ferkel geboren (9687-9690), von denen zwei die Geburt nicht überlebten (9688 und 9689). Die Southern Blot Analyse unter Verwendung der gag-Sonde (Tabelle 19 im Anhang) ergab für das Ferkel 9688, welches bei der Geburt gestorben war, einen Virusintegranten (Abbildung 39A und 39B). Die äußerliche physiologische Begutachtung aller Ferkel des Wurfs war gleich und unauffällig (Abbildung 39C als Beispiel für eines der vier Ferkel). Die Integration des Viruskonstruktes beim verstorbenen Ferkel 9688 war erwartungsgemäß in allen untersuchten Geweben gleich (Abbildung 39D).



**Abbildung 38****Analyse der Ferkel 9536-9542 aus der subzonalen Injektion des U6-shRNA9 lentiviralen Konstruktes.**

(A) Agarosegelelektrophorese nach semiquantitativer PCR auf das Vorhandensein des U6-shRNA9 Konstruktes im Vergleich zu PSF Wildtypzellen (wt) und einem Zellklon mit U6-shRNA Virusintegranten (200-5, 1 Virusintegrant). (B) Southern Blot Analyse der Ferkel zur Virusintegrantenbestimmung im Vergleich zu einem Zellklon mit lentiviralem Integrant (200-5, 1 Virusintegrant). Die gDNA (Ohrprobe) wurde mit *Bam*HI verdaut und der Southern Blot mit U6-shRNA9 Sonde gelabelt. (C) Schematische Darstellung der Bindungsstelle der U6-shRNA9 Sonde und der Schnittstellen von *Sst*I, *Eag*I sowie *Cla*I zur Ermittlung des Methylierungsgrades der gDNA. \*Methylierungssensitive Enzyme *Eag*I und *Cla*I (Restriktion der gDNA an dieser Stelle erfolgt nur, wenn die gDNA nicht methyliert ist). (D) Southern Blot Analyse der Ferkel zur Bestimmung der gDNA Methylierung. Die gDNA von Ferkel 9539 wurde mit *Sst*I/*Eag*I sowie *Sst*I/*Cla*I verdaut und der Southern Blot mit U6-shRNA9 Sonde gelabelt. Die Kontroll-gDNAs wurden nur mit *Sst*I verdaut.

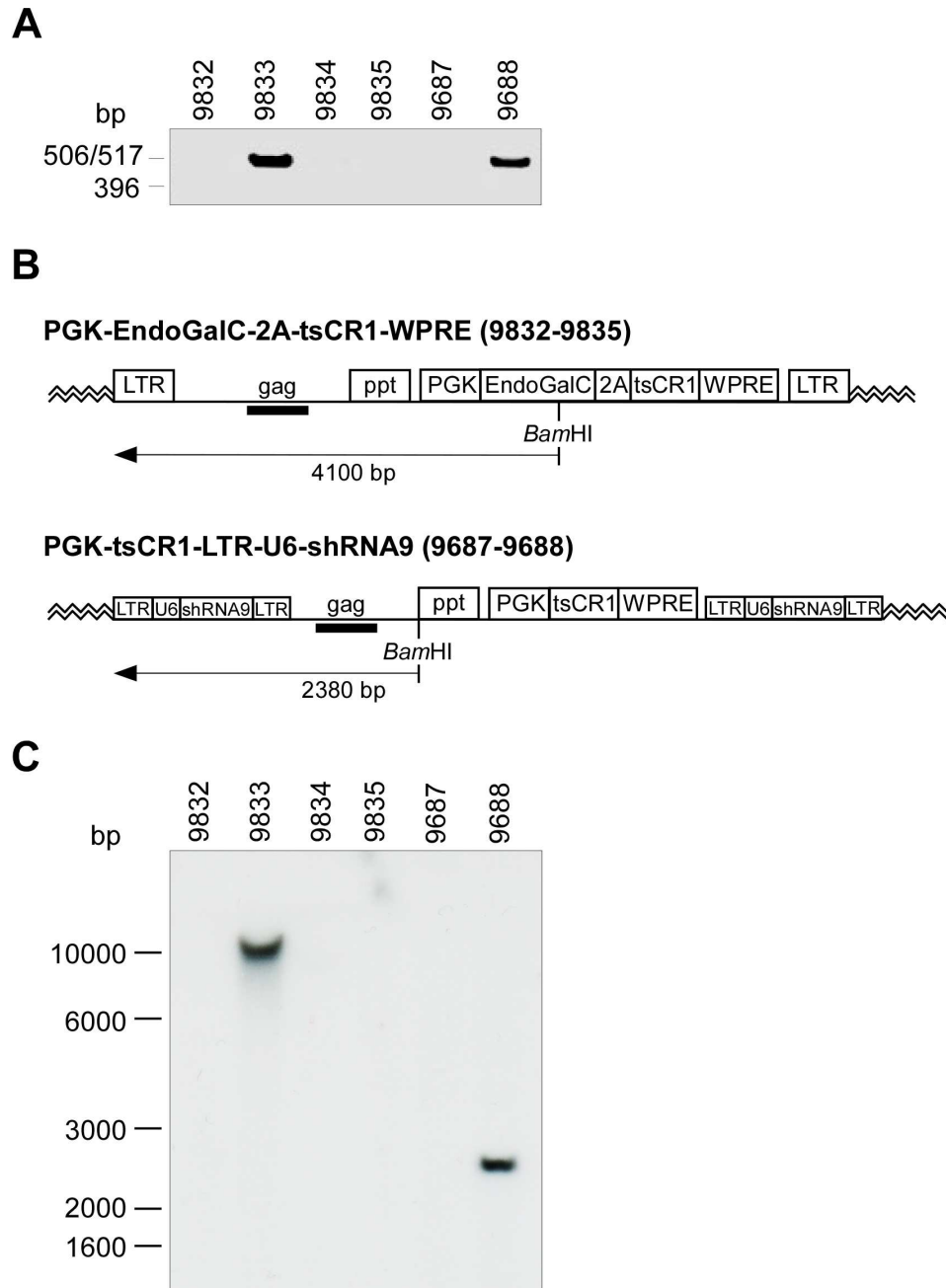
**A****PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9 (9687-9695)****B****C****D****Abbildung 39**

**Analyse der Ferkel 9687-9695 aus der subzonalen Injektion des PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9 lentiviralen Konstruktes.**

(A) Schematische Darstellung der Bindungsstelle der *gag* Sonde und der Schnittstellen von *Bam*HI. (B) Southern Blot Analyse der Ferkel zur Virusintegrantenbestimmung im Vergleich zu den Ferkeln 9539 und 9541 (ein Integrant bzw. kein Integrant, siehe auch Abbildung 38). Die gDNA (Ohrprobe) wurde mit *Bam*HI verdaut und der Southern Blot mit *gag* Sonde gelabelt. (C) Abbildung eines der vier Ferkel des Wurfes. (D) Southern Blot Analyse des Ferkels 9688 zum Integrationsnachweis der lentiviralen DNA in allen untersuchten Geweben im Vergleich zum nicht transgenen Ferkel 9687. Die gDNA aus verschiedenen Geweben wurde mit *Bam*HI verdaut und der Southern Blot mit *gag* Sonde gelabelt.

Nach Transduktion von fetalen PSF Zellen mit dem Viruskonstrukt PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 und anschließendem Nukleustransfer am 07. November 2008 in eine entkernte Eizelle konnten nachfolgend erfolgreich mehrere Embryonen in das Muttertier NT28 eingebracht werden. Von den vier (9832-9835) am 03.03.2009 geborenen Ferkeln überlebten nur drei, das Ferkel 9832 wurde nach zwei Tagen von der Mutter erdrückt (Tabelle 13). Die semiquantitative PCR Analyse ergab im Wurf ein transgenes Ferkel 9833 (Abbildung 40A). Die Southern Blot Analyse unter Verwendung der *gag*-Sonde (Tabelle 19 im Anhang und Abbildung 40B) ergab für das Ferkel 9833 einen Virusintegranten (Abbildung 40C).

Im Anschluss wurden die transgenen Ferkel 9688 (verstorben, Abbildung 39) und 9833 (lebend, Abbildung 40) mittels methylierungssensitiven Southern Blot analysiert, um herauszufinden, ob eine Methylierung des integrierten Provirus vorliegt (Abbildung 41A). Aufgrund der identischen Bandenmuster nach Verdau mit nicht methylierungssensitiven (SstI) sowie methylierungssensitiven (EagI) Enzymen bei Ferkel 9688 (PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9) ließ sich auf eine Methylierung des integrierten Virus und damit auf eine transkriptionelle Inaktivität schließen (Abbildung 41A). Aufgrund der Bandenmusterunterschiede beim Ferkel 9833 (PGK-EndoGalC-2A-tsCR1) kann auf ein Fehlen von Methylierungen der gDNA geschlossen werden und dementsprechend sollte eine transkriptionelle Aktivität vorliegen (Abbildung 41A). Die jeweils zu erwartenden Bandenmuster wurden in Abbildung 41B (PGK-tsC1-LTR-U6-shRNA9) und Abbildung 41C (PGK-EndoGalC-2A-tsCR1) schematisch dargestellt.

**Abbildung 40**

**Analyse der Ferkel 9832-9835 aus dem Kerntransfer nach Transduktion von Zellen mit dem EndoGalC-2A-tsCR1 lentiviralen Konstrukt.**

(A) Agarosegelelektrophorese nach semiquantitativer PCR auf das Vorhandensein des Virusintegranten im Vergleich zu Ferkeln aus Abbildung 39 (9687: kein Integrant, 9688: 1 Integrant PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9).

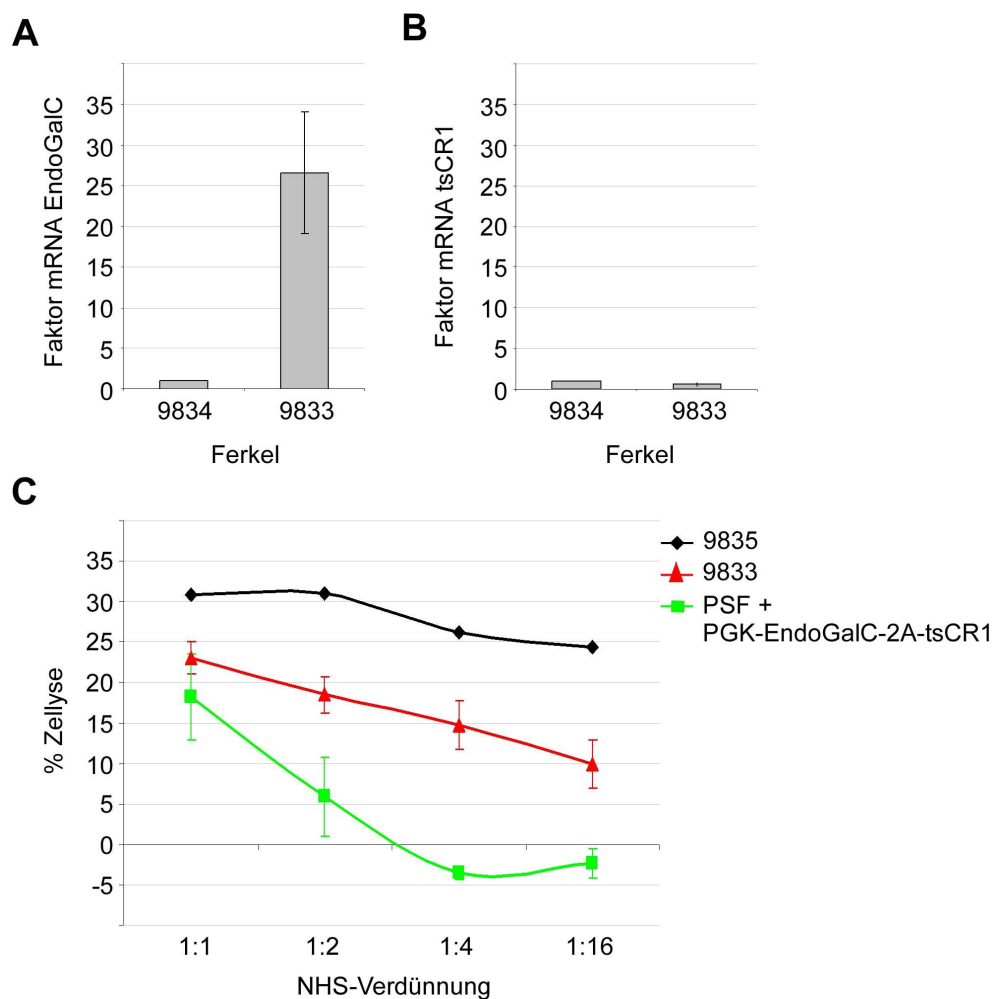
(B) Schematische Darstellung der Bindungsstelle der *gag* Sonde und der Schnittstellen von *Bam*HI. (C) Southern Blot Analyse der Ferkel 9832-9835 zur Virusintegrantenbestimmung im Vergleich zu den Ferkeln 9687 und 9688 (PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9, Abbildung 39). Die gDNA aus verschiedenen Geweben wurde mit *Bam*HI verdaut und der Southern Blot mit *gag* Sonde gelabelt.



### 3.3.3. Funktionelle Analyse des transgenen Schweines 9833

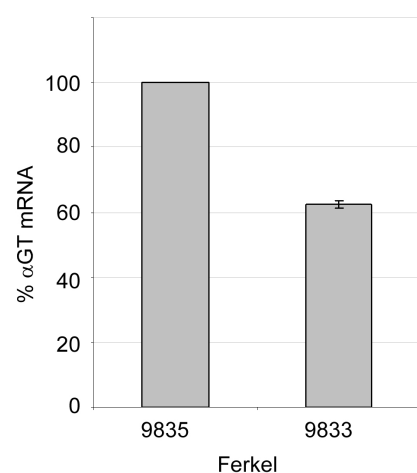
Die Ferkel 9833-9835 aus dem Wurf vom 03.03.2009 (PGK-EndoGalC-2A-tsCR1) wurden für weiterführende Analyse am Leben erhalten. Von dem einzigen Ferkel 9833 mit Virusintegranten (1 Virusintegrant, Abbildung 40) und aktiver Transkription aufgrund fehlender Methylierung des Virusintegrationsbereiches in der gDNA (Abbildung 41) wurden nach Biopsie Zellkulturen angelegt. Per SYBR-Green PCR (2.10.5.) konnte im Ferkel 9833 im Vergleich zum nicht transgenen Geschwistertier desselben Wurfes (9834) eine um den Faktor  $26,58 \pm 7,52$  höhere Expression der EndoGalC mRNA nachgewiesen werden (Abbildung 42A). Die Expression von tsCR1 mRNA im Ferkel 9833 war im Vergleich zum nicht transgenen Geschwistertier nicht nachweisbar (Abbildung 42B). Nach Inkubation von Zellen mit NHS und anschließendem Propidiumiodid-Assay (2.11.5.) zeigten Zellen des Ferkels 9833 im Vergleich zu den Zellen des Geschwistertieres 9835 eine reduzierte Zelllyse (Abbildung 42C), blieb jedoch höher als die Zelllyse von PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 transduzierten PSF Zellen (Abbildung 42C). Da zwar die Expression der EndoGalC mRNA nachgewiesen werden konnte, der Expressionsnachweis der tsCR1 mRNA aber nicht erbracht werden konnte und zusätzlich die Reduktion der Zelllyse der Zellen des Ferkels 9833 nicht ausreichend war, wurde das Tier abschließend getötet.

Abschließend wurde auch das  $\alpha$ GT mRNA level von Zellen der Ferkel 9833 und 9835 per Real-Time PCR (2.10.4.) analysiert (Abbildung 43). Dabei zeigte sich eine geringere  $\alpha$ GT mRNA Abundanz von Ferkel 9833 gegenüber dem Geschwistertier 9835. Die Expression der  $\alpha$ GT mRNA im Ferkel 9833 sollte durch das lentivirale Konstrukt PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 unberührt bleiben, da das Konstrukt keine shRNA-Kassette enthält. Diese Ergebnisse spiegeln demnach die natürlichen Schwankungen in der Menge der  $\alpha$ GT mRNA Expression unter den Geschwistertieren wider.

**Abbildung 42**

**Funktionelle Analyse des transgenen Ferkels 9833 im Vergleich zu Geschwistertieren 9834 bzw. 9835.**

(A) Faktor der EndoGalC mRNA Expression nach SYBR-Green PCR im Vergleich zum Geschwistertier 9834. (B) Faktor der tsCR1 mRNA Expression nach SYBR-Green PCR im Vergleich zum Geschwistertier 9834. (C) Prozentuale Zellyse von 9833 Zellen nach Inkubation mit NHS und anschließenden Propidiumiodid-Assay im Vergleich zu Zellen des Geschwistertieres 9835 sowie PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 (200ng *RT*) transduzierten PSF Zellen. n=3, MW  $\pm$  SEM.

**Abbildung 43**

**$\alpha$ GT mRNA Expression der Ferkel 9835 und 9833, in % gegenüber Ferkel 9835.**

Die drei aufgezeigten Würfe mit den drei transgenen Tieren (9539, 9688 und 9833) im Zeitraum von 2006 bis 2009 wurden in Tabelle 14 zusammengefaßt. Alle drei transgenen Tiere wurden nach Abschluß der Analysen getötet, zum einen aus Gründen des Silencing des Virusintegranten (9539 und 9688) und zum anderen aus Gründen der nicht ausreichenden Reduktionspotentiale von  $\alpha$ gal Epitopen und Zelllyse durch einen viralen Integranten (9833).

**Tabelle 14**  
**Auflistung der drei Würfe mit den daraus resultierenden transgenen Ferkeln.**

Lentivirales Konstrukt	Datum Subzonale Injektion	Datum ET nach Nukleus-transfer	Mutter	Geburt	Ferkel	Status bei Geburt	Anzahl Integranten	Silencing	Status aktuell
U6-shRNA9	26.06.2006		446	15.10.2006	9536	lebend	0		tot
					9537	lebend	0		tot
					9538	tot	0		tot
					9539	lebend	1	Ja	tot
					9540	lebend	0		tot
					9541	lebend	0		tot
					9542	tot	0		tot
PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	28.01.2008		478	19.05.2008	9687	tot	0		tot
					9688	tot	1	Ja	tot
					9689	lebend	0		tot
					9690	lebend	0		tot
PGK-EndoGalC-2A-tsCR1		07.11.2008	NT28	03.03.2009	9832	lebend*	0		tot
					9833	lebend	1	Nein	tot
					9834	lebend	0		tot
					9835	lebend	0		tot

\* Ferkel 9832 wurde 2 Tage nach der Geburt durch die Mutter erdrückt.



## 4. Diskussion

### 4.1. Auf der Suche nach der shRNA mit dem höchsten $\alpha$ GT mRNA Silencing Potential

Eine Vielzahl vorangegangener Arbeiten auf dem Gebiet der RNAi (siRNA und shRNA) zum erfolgreichen Knockdown von Zielgenen mittels lentiviraler Vektoren (Rubinson *et al* 2003, Tiscornia *et al* 2003, Stewart *et al* 2003, Zhu *et al* 2005) haben es ermöglicht, innerhalb der vorliegenden Arbeit in kurzer Zeit eine effektive Strategie zum Silencing der mRNA der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase ( $\alpha$ GT) zu entwickeln. Die Sekundärstruktur des Zielgenes  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase bot sehr viele mögliche Angriffspunkte für die siRNA Silencing Maschinerie, so dass unter Anwendung entsprechender publizierter Regeln für das si/shRNA-Design einige wenige Bereiche ermittelt werden konnten, die mit höchster Wahrscheinlichkeit zu einem erfolgreichen Knockdown führen sollten und somit den Grundstein für diese Arbeit legten (Zucker *et al* 2003, 3.1.1. und Abbildung 12B). Um den bestmöglichen Knockdown mittels shRNA codierender lentiviraler Vektoren zu erreichen, wurden insgesamt 18 verschiedene shRNA Sequenzen mit den aktuellsten veröffentlichten Merkmalen (Reynolds *et al* 2004) unter Berücksichtigung der Sekundärstrukturberechnungen (Zucker *et al* 2003, Mathews *et al* 2004), unterschiedlichen Sequenzlängen (Kim *et al* 2005), optimaler thermodynamischer Stabilität (Heale *et al* 2005), der shRNA Orientierung (Harborth *et al* 2005), dem GC Gehalt und verschiedensten firmeneigenen Algorithmen (B-Bridge, EuroGeneTech) generiert und getestet (3.1.2. und Tabelle 15 im Anhang).

Bei den beiden generierten shRNAs 1 und 5 konnte keine Minimierung des  $\alpha$ GT mRNA levels mittels Real-Time-PCR Analyse festgestellt werden (3.1.3. und Abbildung 14B: shRNA1: 104,16%  $\pm$  16,21; shRNA5: 116,20%  $\pm$  12,78). Thermodynamisch ungünstige Sekundärstrukturen der entstandenen siRNAs und darausfolgend eine schlechtere Bindung im RNAi Interference Silencing Complex (RISC) könnten eine Ursache für die fehlende  $\alpha$ GT mRNA Reduktion durch die siRNAs 1 und 5 gewesen sein (3.1.2. und Abbildung 13A sowie 13B). Neben der siRNA Sekundärstruktur könnte auch die Orientierung der siRNA in der shRNA einen direkten Einfluß auf die  $\alpha$ GT Transkriptionsrate aufweisen, indem bevorzugt der sense Strang (bei Orientierung der shRNA sense-loop-antisense, sas) statt dem antisense Strang (bei Orientierung der shRNA antisense-loop-sense, ass) im RISC gebunden wurde und

somit kaum ein Silencing Effekt der  $\alpha$ GT mRNA hervorgerufen werden kann. Es muss an dieser Stelle jedoch auch erwähnt werden, dass es auch Publikationen gibt, wo die *antisense* Orientierung für das optimale Silencing des Zielgenes gewählt wurde (Übersicht unter <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/References/Ambion-Tech-Support/rnai-sirna.html>). Bei der shRNA12 mit der *antisense* Orientierung konnte eine stärkere  $\alpha$ GT mRNA Reduktion (auf 31,06%) im Vergleich zur gegenläufigen Orientierung *sense* auf nur 87,81%  $\pm$  21,30 diesen Effekt aufzeigen (3.1.4. und Abbildung 15E sowie 15F). Während die durch die Firmen EuroGeneTech (Köln) und B-Bridge (USA) generierten shRNAs 13-17 nur mittlere  $\alpha$ GT mRNA Reduktionen auf level zwischen 84,74%  $\pm$  5,35 (shRNA13) und 36,15%  $\pm$  9,94 (shRNA16) erzielten und die shRNA10 sogar einen nicht erklärbaren Anstieg der  $\alpha$ GT mRNA (auf 193,65%  $\pm$  15,60) aufwies, konnten die größten ermittelten  $\alpha$ GT mRNA Reduktionen durch die selbst designte shRNA 9 (auf 15,80%  $\pm$  2,21) sowie die durch Zhu *et al* (Zhu *et al* 2005 und 2008) beschriebene shRNA20 (auf 11,58%  $\pm$  1,41) nachgewiesen werden (3.1.3. und Abbildung 14B). Diese beiden shRNA Sequenzen wiesen auch fast alle oben erwähnten Merkmale von shRNAs für einen erfolgreichen Knockdown des Zielgenes auf (3.1.2. und Tabelle 15 im Anhang). Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit das erfolgreiche Silencing mittels veröffentlichten Merkmalen bestätigt werden.

Für den weiteren Verlauf der Experimente wurde die shRNA9 stärker in den Fokus gerückt als die shRNA20. Die Ursachen lagen unter anderem darin, dass die durch Zhu *et al* veröffentlichte Sequenz lediglich als Positivtest des verwendeten Vektorsystems dienen sollte. Die U6-shRNA20 Konstrukte wiesen zudem eine ausgeprägte Toxizität in den infizierten PSF Zellen auf (3.1.5.1. und Abbildung 18) und im Tiermodell konnte keine erfolgreiche Trächtigkeit erreicht werden (3.3.1. und Tabelle 17 im Anhang). Der favorisierte U6 Promoter (pTZU6+1 Plasmid, 6.3.1.) zur Transkription der shRNA wurde bereits in vielen Publikationen erfolgreich verwendet (Mäkinen *et al* 2006, Lee *et al* 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls, dass der U6-Promoter geeignet ist, da das Knockdown Potential auf die  $\alpha$ GT mRNA hier am größten war. Dies zeigte sich in Versuchen mit shRNA2 und shRNA9 und Einsatz der Promotoren U6, MTD, H1, U6.3, 1.0-U6 (3.1.4.2.), wobei die Verwendung des U6 Promoters jeweils die höchsten  $\alpha$ GT mRNA Reduktionen erzielte (U6-shRNA2: 17,98%  $\pm$  1,73, U6-shRNA9: 15,80%  $\pm$  2,21; Abbildung 16 B sowie 16C). Die höhere Effektivität des U6 Promoters im Vergleich zum H1 Promoter konnte zusätzlich durch vermehrt gebildete siRNA Mengen nachgewiesen werden (3.1.5.4. und Abbildung 21). Der von An *et al* (An *et al* 2006) geäußerte Verdacht der Zytotoxizität des U6 Promoters in humanen Lymphozyten konnte in dieser Arbeit im allgemeinen nicht

bestätigt werden (3.1.5.1. und Abbildung 18). Die weiterführenden Klonierungen zur Generierung von noch effizienteren lentiviralen RNAi-Vektoren mit mehreren U6-shRNA Expressionskassetten zeigten, dass eine Verdopplung oder gar Verdreifachung der Expressionskassetten in der Multiple Cloning Site (MCS) lediglich geringe zusätzliche Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA (auf 15,80%  $\pm$  2,21 bei 1xU6-shRNA9, 8,98%  $\pm$  1,31 bei 2xU6-shRNA9, 8,12%  $\pm$  1,50 bei 3xU6-shRNA9) oder Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope (54,87%  $\pm$  16,20 bei 1xU6-shRNA9, 53,69% bei 3xU6-shRNA9) bedingten (3.1.4.3. und Abbildung 17). Eine Ursache hierfür könnte die direkte Nähe von zwei bzw. drei aktiven U6 Promotoren sein, welche sich durch Bindung der Transkriptionsmaschinerie und durch die nur sehr kurzen shRNA Sequenzen dazwischen behindern könnten. Die Klonierung der U6-shRNA9 Kassette in die lentivirale Long Terminal Repeat Sequenz (LTR) zeigte hingegen hohe Knockdown Potentiale bei der  $\alpha$ GT mRNA (17,24%  $\pm$  2,05), bei den  $\alpha$ gal Epitopen (40,42%  $\pm$  8,09) und beim Schutz vor Zelllyse durch humanes Komplement (0,38%  $\pm$  1,10 bei Komplementverdünnung 1:2) (3.1.4.3., 3.1.5.3. sowie 3.1.5.5.). Die Klonierung der Kassette in die 3'LTR hat den Vorteil, dass das RNA Genom der produzierten lentiviralen Vektoren nur einmal die U6-shRNA Kassette enthält, der im Wirtszellgenom integrierte Provirus jedoch (bedingt durch die LTR Konversion bei der reversen Transkription) zweimal die Expressionskassette enthält. Dies spart nicht nur Zeit bei der Klonierung, sondern ist auch hinsichtlich übriger verfügbarer Klonierungskapazität günstig, da somit mehr Platz für andere Transgenkassetten zur Verfügung steht (maximale Genomkapazität der lentiviralen Vektoren: 12kb). Bei der Transduktion von PSF Zellen mit 200ng *RT* konnten jeweils ähnlich starke Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA level und  $\alpha$ gal Epitope unter Verwendung von U6-shRNA9 (15,80%  $\pm$  2,21 und 54,87%  $\pm$  16,20) und LTR-U6-shRNA9 (17,24%  $\pm$  2,05 und 40,42%  $\pm$  8,09) gezeigt werden (3.1.5.3. und Abbildung 20B). Eine Verdreifachung der Virusmenge auf 600ng *RT* wies bei Verwendung des LTR-U6-shRNA9 Konstruktes jeweils höhere Reduktionen im Vergleich zum U6-shRNA9 Konstrukt auf, sowohl beim  $\alpha$ GT mRNA level (8,74%  $\pm$  1,88 vs. 13,41%  $\pm$  1,82) als auch bei der Abundanz der  $\alpha$ gal Epitope (10,67%  $\pm$  2,61 vs. 47,20%) (3.1.4.3. mit Abbildung 17C und 3.1.5.3. mit Abbildung 20A).

## 4.2. Mit U6-shRNA lentiviralen Vektoren zu Zellklonen mit stabiler shRNA Expression

Aufgrund der guten Silencing Effekte des U6-shRNA9 Konstruktes in PSF Mischpopulationen wurden zur Austestung der stabilen Funktionalität PSF Zellklone generiert. Der Vorteil der Generierung von Zellklonen liegt darin, dass keine untransduzierten Zellen im Verlauf vieler Passagen während der Zellkultur die RNAi-Effekte aufheben (3.1.6.3. und Abbildung 26).

Da bei den PSF Mischpopulationen durch Erhöhung der Virusmenge von 200ng auf 600ng *RT* das  $\alpha$ GT mRNA level (von  $15,80\% \pm 2,21$  auf  $13,41\% \pm 1,82$ ; 3.1.4.3. mit Abbildung 17C) und die Anzahl  $\alpha$ gal Epitope (von  $54,87\% \pm 16,20$  auf  $47,20\%$ ; 3.1.5.3. mit Abbildung 20A) jeweils reduziert wurde und auch der Lyseschutz durch humanes Komplement (von  $4,55\% \pm 2,29$  auf  $0,3\% \pm 1,06$  bei Komplementverdünnung 1:2; 3.1.5.5. mit Abbildung 22B) verstärkt werden konnte, wurden PSF Zellklone durch Transduktion mit 600ng *RT* U6-shRNA9 generiert (2.10.1.). Um sicher zu stellen, dass auch Zellklone mit nur einem Virusintegranten entstehen, wurden auch Zellklone über die Transduktion von PSF Zellen mit 25ng, 50ng sowie 200ng *RT* U6-shRNA9 generiert. Erwartungsgemäß korrelierte die Virusintegrantenzahl mit der verwendeten Virusmenge (3.1.6.1. und Abbildung 23B). Bei 25ng Virus-*RT* betrug die durchschnittliche Virusintegrantenzahl 0,16, bei 600ng Virus-*RT* betrug sie durchschnittlich 2,14 (Tabelle 11). Zwei Phänomene waren bei der Zellklongenerierung auffällig: Zum einen war die Zellklonausbeute in Anbetracht von 209 gepickten Zellklonen gering: nur 54,5% (114 Klone) der gepickten Zellklone waren angewachsen und davon trugen nur 33,3% (38 Klone) mindestens einen oder mehr Virusintegranten. Zum anderen fielen das sehr langsame Zellwachstum und teilweise morphologische Zellveränderungen der Klone (mikroskopische Daten nicht gezeigt) im allgemeinen auf und häufig zeigten ursprünglich angewachsene Zellklone kein weiteres Wachstum aufgrund gestoppter Zellteilung. Dies spiegelte sich auch bei der Betrachtung der Überlebensraten wider: so überlebten 78,57% bei den 25ng *RT* Zellklonen und lediglich 9,59% bei den 600ng *RT* Zellklonen (Tabelle 11). Eine von vielen möglichen Ursachen dieser Phänomene könnte die willkürliche Virusintegration ins Wirtsgenom sein. Wenn bei der Virusgenomintegration wichtige Genbereiche für Zellstoffwechselaktivitäten unterbrochen werden, kann der genetisch manipulierte Zellklon in seinen Stoffwechsel- und Wachstumseigenschaften stark eingeschränkt sein. Diese willkürliche Integration von lentiviralen Vektoren ins Wirtsgenom ist nicht nur bei den Zellklonen, sondern auch bei der

Generierung von Trächtigkeiten eine nicht kalkulierbare Ursache für die teilweise geringen Erfolgsquoten der Methodik. Der Verdacht der Toxizität des U6 Promoters in den PSF Zellen hatte sich in den vorangegangenen Experimenten nicht bestätigt (3.1.5.1. und Abbildung 18) und konnte als Ursache für das Absterben generierter Zellklone ausgeschlossen werden (An *et al* 2006). Zellklone mit einem bis drei Virusintegranten konnten durch Transduktion mit allen Virusmengen (25-600ng Virus-RT) nach dem Zufallsprinzip der Integration generiert werden (Tabelle 16 im Anhang). Zellklone mit vier (Zellklone 23, 39, 42 und 126) und sechs (Zellklon 135) Virusintegranten entstanden hingegen nur bei Transduktion von 200ng und 600ng RT (Tabelle 16 im Anhang). Die Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA und  $\alpha$ gal Epitop Level korrelierten direkt mit der Anzahl der Virusintegranten: je mehr Integranten, desto höher war das Knockdown Potential (3.1.6.2. und Abbildung 24 sowie 3.1.6.5. und Abbildung 28A). Bei der Betrachtung individueller Zellklone gab es auch welche, die keine direkte Korrelation von Knockdown und Virusintegrantenzahl aufwiesen. Beispiele wären der Zellklon 25 mit nur einem Virusintegranten, aber einer ausgeprägten  $\alpha$ GT mRNA Reduktion auf  $17,53\% \pm 8,15$  und der Zellklon 38 mit drei Virusintegranten, aber einer eher geringen Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA auf  $60,38\% \pm 9,43$  (3.1.6.2. und Abbildung 25). Diese fehlende Korrelation könnte darin begründet liegen, dass Faktoren wie Integrationsort und Methylierungsgrad und damit die transkriptionelle Aktivität gerade bei vielfacher Virusintegrantenzahl eine essentielle Rolle spielen. Bei den aufgrund des guten Zellwachstums ausgewählten repräsentativen Zellklonen 12 (zwei Virusintegranten), 24 (drei Virusintegranten) und 126 (vier Virusintegranten) zeigte sich eine gute Korrelation aus Virusintegrantenzahl,  $\alpha$ GT mRNA level (Zellklon 12:  $36,90\% \pm 4,62$ , Zellklon 24  $13,92\% \pm 0,93$ , Zellklon 126:  $5,90\% \pm 0,57$ ) und  $\alpha$ gal Epitop level (Zellklon 12:  $61,13\% \pm 10,57$ , Zellklon 24:  $33,33\% \pm 6,03$ , Zellklon 126:  $14,14\% \pm 2,02$ ) (3.1.6.5. und Abbildung 28C). Der Zellklon 117 mit zwei Virusintegranten wies eine starke Reduktion der  $\alpha$ GT mRNA auf ( $15,27\% \pm 1,77$ ), eine mittlere Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope ( $50,22\% \pm 5,86$ ) und den stärksten Schutz vor Zelllyse durch humanes Komplement ( $-1,03\% \pm 2,77$  bei einer Komplementverdünnung von 1:2) (3.1.6.5. und Abbildung 28C sowie 3.1.6.6. und Abbildung 29). Dieser geringe Zelllysegrad an der Nachweisgrenze der Methode lag sogar unter dem von  $\text{igal}^{-/-}$  Zellen ( $0,41\% \pm 1,11$  bei einer Komplementverdünnung von 1:2), welche aufgrund des Knockout der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase keine  $\alpha$ gal Epitope auf der Zelloberfläche mehr tragen, demnach kaum durch NHS lysiert werden sollten und damit einen sehr geringen Lysegrad aufweisen (3.1.6.6. und Abbildung 29). Der Zellklon 126 mit vier Virusintegranten wies hingegen trotz bester Knockdown Ergebnisse ( $\alpha$ GT mRNA  $5,90\% \pm 0,57$  und  $\alpha$ gal Epitope  $14,14\% \pm 2,02$ ) die

höchste gemessene Zelllyse (3,12%, n=1) auf. Eine Ursache dieser unterschiedlichen Ergebnisse der Zelllyseexperimente bei den beiden Zellklonen (117 und 126) könnte eine hohe spontane Apoptoserate des Zellklones 126 sein, welche ein falsch-positives Ergebnis hervorrufen könnte. Dies müsste in weiterführenden Zelllyseexperimenten für den Zellklon 126 noch bestätigt werden, wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Zellklone die U6-shRNA9 stabil exprimieren. Im allgemeinen wurden mit steigender Virusintegrantenzahl der Zellklone höhere siRNA9 Mengen (3.1.6.7.) sowie steigende Knockdownraten hinsichtlich der  $\alpha$ GT mRNA (3.1.6.2.) und  $\alpha$ gal Epitope (3.1.6.5.) nachgewiesen.

#### 4.3. Mit multitransgenen lentiviralen Vektoren zur verzögerten Abstoßungsreaktion

Die maximal mögliche Kapazität des Wildtyp-HIV Genoms beträgt 12kb, was gleichzeitig die maximal mögliche Genomgröße der auf dem HIV-basierenden und in der vorliegenden Arbeit verwendeten lentiviralen Vektoren darstellt (Modrow 2010, Lu *et al* 2011). Die Klonierung der multitransgenen Plasmide erfolgte wie beschrieben mit der platzsparenden Lokalisation der U6-shRNA9 Kassette in der LTR und der Transgene EndoGalC und tsCR1 in der MCS (3.2.1. und Abbildung 31).

Dabei konnte sowohl die erfolgreiche Transgenüberexpression von EndoGalC und tsCR1 (3.2.2. und 3.2.3., Abbildung 32, 33 und 34) als auch die Funktionalität hinsichtlich der Reduktionen der  $\alpha$ gal Epitope (3.2.4. und Abbildung 35B) und der Reduktion der Zelllyse (3.2.4. und Abbildung 36B) in infizierten PSF Mischpopulationen und PSF Zellklonen gezeigt werden.

Die EndoGalC Überexpression wurde durch Ermittlung der EndoGalC mRNA nachgewiesen. Durch Transduktion von PSF Zellen mit dem Einzelkonstrukt PGK-EndoGalC konnte die Expression mit erhöhter Virusmenge (600ng RT) auf das fast dreifache gegenüber der Verwendung von 200ng RT (283,90% vs. 100%) gesteigert werden (3.2.2. und Abbildung 33A). Eine Virusmenge von 200ng RT PGK-EndoGalC war jedoch bereits ausreichend, um die  $\alpha$ gal Epitope auf 73,55% zu reduzieren (3.2.4. und Abbildung 35B). Das Doppelkonstrukt PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 wies erwartungsgemäß ähnliche Reduktionen der  $\alpha$ GT mRNA im Vergleich zum LTR-U6-shRNA9 Konstrukt auf (21,33%  $\pm$  0,93 bei PGK-

EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 und  $17,24\% \pm 2,05$  bei LTR-U6-shRNA9), da die Überexpression der EndoGalC keinen Einfluss auf die mRNA der  $\alpha$ GT haben sollte. Durch Expression der EndoGalC zusätzlich zum Knockdown der  $\alpha$ GT konnte eine stärkere Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope ( $21,94\% \pm 2,71$  bei PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 und  $40,42\% \pm 8,09$  bei LTR-U6-shRNA9) erzielt werden (3.2.4. und Abbildung 35). Die gemessene Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope durch 200ng Virus-RT des Doppelkonstruktes PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9 lag damit im Bereich der Reduktionen, die erreicht wurden mit den zwei besten U6-shRNA9 Zellklonen 42 ( $9,58\% \pm 1,87$ ) und 126 ( $14,14\% \pm 2,02$ ) (3.1.6.5. und Abbildung 28C).

Die tsCR1 Überexpression wurde durch Ermittlung der tsCR1 mRNA mittels Real-Time PCR (3.2.2. und Abbildung 33B), des tsCR1 Proteins (3.2.3. und Abbildung 34) sowie die Funktionalität durch Reduktion der Zelllyse durch humanes Komplement (3.2.4. und Abbildung 36B) nachgewiesen.

Beim Doppeltransgenkonstrukt PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 (200ng RT) war zu beobachten, dass die mRNA-Expression des ersten Transgens (EndoGalC) im Vergleich zum Einzelkonstrukt PGK-EndoGalC ähnlich stark war (100% beim Einzelkonstrukt,  $85,47\% \pm 22,63$  beim Doppeltransgenkonstrukt), die mRNA-Expression des zweiten Transgens (tsCR1) im Vergleich zum Einzelkonstrukt PGK-tsCR1 hingegen auffällig große Unterschiede zeigte (100% beim Einzelkonstrukt,  $13,13\% \pm 3,28$  beim Doppeltransgenkonstrukt) (3.2.2. und Abbildung 33A und 33B).

Diese Expressionsraten der Transgene im Doppeltransgenkonstrukt lassen sich durch Transduktion mit der erhöhten Virusmengen von 600ng RT PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 verbessern (EndoGalC mRNA von  $85,47\% \pm 22,63$  auf  $156\% \pm 34,22$  und tsCR1 mRNA von  $13,13\% \pm 3,28$  auf  $31,14\% \pm 0,58$ ) (3.2.2. und Abbildung 33A und 33B). Die Ursache der reduzierten Expressionslevel von tsCR1, dem Transgen nach dem 2A-Element, könnte am verwendeten 2A Element selbst liegen: Wenn das lange Primärtranskript, bestehend aus der EndoGalC und tsCR1 mRNA, in der Wirtszelle ineffektiv am 2A Element gespalten wird, könnte die Expressionsmenge beider Transgene beeinflusst werden. Auch verbleibende Basen des 2A Elementes an der tsCR1 Sequenz könnten zu einer ineffektiven Faltung des entstehenden Proteins und damit zur verminderten Sekretion und demzufolge auch zu einer verringerten Funktionalität führen (Chinnasamy *et al* 2006, de Felipe *et al* 2003, Hasegawa *et al* 2007). Es sei hier auch zu beachten, dass die Analyse der Mischpopulationen nach Transduktion mit denselben Mengen Virus RT erfolgte. Die Virus RT Konzentration spiegeln jedoch nur den Gehalt an aktiver Reverser Transkriptase wider, nicht die biologische Aktivität

der viralen Vektoren. Diese kann variieren, trotz gleicher Virus *RT* Konzentration, und damit zu Unterschieden in der durchschnittlichen Transgenexpression (Schwankungen der mRNA level) in der Mischpopulation führen.

Der Schutz vor Zelllyse durch humanes Komplement war durch die Überexpression von EndoGalC (in PGK-EndoGalC) und einer damit einhergehenden geringeren Anzahl  $\alpha$ gal Epitope stärker ausgeprägt ( $-4,79\% \pm 6,07$  bei einer Komplementverdünnung 1:2 und 200ng Virusmenge) als durch die Überexpression von tsCR1 (in PGK-tsCR1:  $9,33\% \pm 2,28$  bei einer Komplementverdünnung 1:2 und 200ng Virusmenge) (3.2.4. und Abbildung 36A). Der schützende Effekt vor Zelllyse durch tsCR1 konnte jedoch durch Erhöhung der initialen Virusmengen von 200ng auf 600ng *RT* erhöht werden (3.2.4. und Abbildung 36B). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass das optimalste Konstrukt in diesem Zusammenhang PGK-EndoGalC-2A-tsCR1-LTR-U6-shRNA9 wäre unter Verwendung von mindestens 600ng *RT* Viruslast, um in den PSF Zellen und anschließend im Versuchstier eine Kombination aller Reduktionen zu erlangen und um eine maximal mögliche Funktionalität vor einer Abstoßungsreaktion zu gewährleisten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte aus zeitlichen Gründen keine Klonierung eines solchen Tripelkonstruktes.

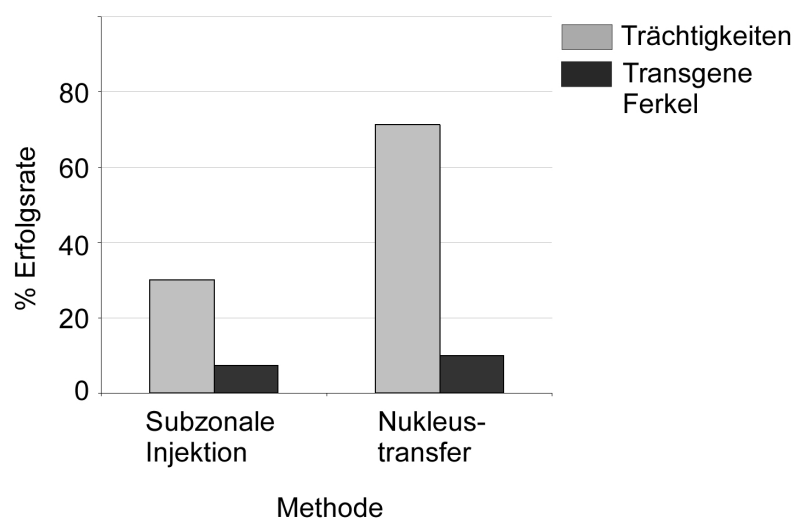
Zusammenfassend konnte die Funktionalität des Transgenes EndoGalC hinsichtlich zusätzlicher Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope durch starke Überexpression der EndoGalC mRNA gezeigt werden (3.2.2. und 3.2.4.). Auch tsCR1 konnte als Protein und mRNA nachgewiesen werden und zeigte einen Schutz vor Zelllyse (3.2.2., 3.2.3. und 3.2.4.). Nur bei der Kombination beider Transgene im PGK-EndoGalC-2A-tsCR1 Konstrukt wurden schwächere Expressionsraten der Transgen mRNA gemessen gefolgt von einer schwächeren Funktionalität, vor allem beim Transgen tsCR1 (3.2.4.). Ausreichende Expressionsmengen der Transgene könnten im Versuchstier also nur entstehen, wenn die initiale Virusmenge zur Generierung der transgenen Schweine so hoch wie möglich gewählt wird.

#### 4.4. Generierung multitransgener Schweine als Endziel

Das Ziel aller *in vitro*-Versuche war das Finden von Konstrukten, die zur Generierung von transgenen Schweinen herangezogen werden können, um bei einer potentiellen Verwendung der Organe in der Xenotransplantationsmedizin zu geringeren Abstoßungsraten zu führen. Daher war begleitend zu den *in vitro* Versuchen die Generierung transgener Schweine und deren Charakterisierung ein wichtiger Aspekt der Arbeit.



Die Erfolgsrate der 27 durchgeführten Embryonaltransfere in einem Zeitraum von März 2006 bis März 2009, wovon bei 20 die Embryonen nach subzonalen Virusinjektionen und bei 7 die Embryonen nach Kerntransfer generiert wurden, war mit insgesamt drei positiv transgenen Ferkeln aus 37 geborenen Ferkeln (8,11%) im allgemeinen sehr gering (Tabelle 14, Tabelle 17 und 18 im Anhang). Die Erfolgsrate der insgesamt 11 erzielten Trächtigkeiten bei 27 durchgeführten Embryonaltransferen (ET), unabhängig von der Methode, betrug damit 40,74%. Die subzonale Virusinjektion führte dabei zu insgesamt 27 geborenen und davon zwei transgenen Ferkeln (Tabelle 14, Tabelle 17 im Anhang). Dies entspricht einer Effizienz von 7,41%. Im Vergleich zur Methode der subzonalen Virusinjektion war die Effizienz der Trächtigkeiten beim Nukleustransfer höher (5 Trächtigkeiten und mit 10 Ferkel, Tabelle 18 im Anhang), und zwar um den Faktor 2,4, das entspricht einer Erhöhung von 30% auf 71,43% (Abbildung 44). Die Effizienz des Kerntransfers hinsichtlich der Anzahl transgener Ferkel war aber lediglich um den Faktor 1,4 höher, das entspricht einer Erhöhung von 7,41% auf 10%. Bei der Etablierung der Methode zur Generierung transgener Schweine mittels subzonaler Injektion und anschließendem Embryonaltransfer konnten zuvor sehr viel höhere Erfolgsraten von 70% positiver Transgenese erzielt werden (Hofmann *et al* 2003). Die Ursache für die sehr viel geringere Effizienz bei den durchgeführten subzonalen Injektionen in dieser Arbeit lässt sich nicht abschließend klären. Eine Möglichkeit besteht sicher in den verwendeten Konstrukten und ihren möglichen Einfluß auf die Embryogenese nach Injektion. Während der Methodenetablierung wurden nur Reportergene verwendet (Hofmann *et al* 2003).



**Abbildung 44**

**Vergleich der Methoden subzonale Injektion und Nukleustransfer hinsichtlich der Erfolgsraten für Trächtigkeit und transgene Ferkel zur Generierung transgener Schweine in %.**

Werden die Effizienzen der Methoden mit den allgemein üblichen Wurfgrößen etc. verglichen, so kann eine allgemein schlechte Erfolgsrate festgestellt werden. In dem Zeitraum von 2004 bis 2011 stieg beispielsweise in Niedersachsen die durchschnittliche Ferkelzahl von 9,42 auf 11,06 pro Muttertier an (<http://www.susonline.de/meldungen/management/Niedersachsen-Ringbetriebe-setzten-26-Ferkel-ab-699799.html>). Eine durchschnittliche Sau ovuliert je Zyklus ca. 20 Eizellen aus denen die durchschnittlichen 11 Ferkel resultieren (<http://www.landwirt.com/Zuchtsauen-Embryonale-Sterblichkeit-entscheidend-fuer-Wurfgroesse,,6213,,Bericht.html>). In der vorliegenden Arbeit wurden den Muttertieren 28 bis 185 Embryonen (nach subzonaler Injektion oder Nukleustransfer) eingepflanzt (Tabelle 17 und 18 im Anhang). Die durchschnittliche Wurfgröße von 5,40 Ferkeln pro Muttertier bei der Methode der subzonalen Injektion und 3,33 Ferkeln pro Muttertier bei der Methode des Kerntransfers lag damit deutlich unter den in der Zucht üblichen Werten. Auch der durchschnittliche Ferkelverlust von 14-15% bei und nach der Geburt (<http://www.susonline.de/meldungen/management/Niedersachsen-Ringbetriebe-setzten-26-Ferkel-ab-699799.html>) wurde mit 33,33% bei der subzonalen Injektion überschritten. Ein Grund für diese niedrige Erfolgsrate könnte die Verwendung von Jungsauen als Muttertiere gewesen sein, denn mit jedem erfolgreichen Wurf steigt erfahrungsgemäß die Ferkelanzahl und die Überlebensrate der Ferkel ([http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/heusingm\\_ws03.html](http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/heusingm_ws03.html)). Der Hauptgrund könnte jedoch in der genetischen Veränderung durch die viralen Vektoren und deren Beeinflussung von Stoffwechsel und Teilungsverhalten je nach Integrationsort gewesen sein, was bereits in den *in vitro* Versuchen anhand von hohen Zellklonverlusten, verlangsamten Wachstumsraten und morphologischen Zellveränderungen beobachtet werden konnte (3.1.5.1. und Tabelle 11). Alle drei positiv transgenen Ferkel (9539, 9688 und 9833) trugen jeweils einen viralen Integranten, wobei aber nur beim Ferkel 9833 (PGK-EndoGalC-2A-tsCR1) der Integrant transkriptionell aktiv war (3.3.2., Abbildung 41A und 42). Das entsprach einer effektiven Transgenese von 33,3%, was deutlich unter den erreichten 94% effektive Transgenese bei der Methodenetablierung (Hofmann *et al* 2003) lag. Generell stellt das transkriptionelle Silencing der eingebrachten Sequenzen (*de novo* Hypermethylierungen von CpG-Nukleotiden innerhalb der viralen oder transgenen Sequenz) in der frühen embryonalen Entwicklung einen großen Nachteil der retroviralen Transgenese dar (Speers *et al* 1980, Teich *et al* 1977, Ellis und Yao 2005, Sifuentes-Romero *et al* 2011, Jahner *et al* 1982, Laker *et al* 1998, Jones und Takai 2001). Die EndoGalC mRNA Überexpression konnte beim einzigen in dieser Arbeit erzeugten und nicht Provirus-methylierten transgenen Ferkel 9833 nachgewiesen werden (3.3.2. und Abbildung 42A). Die

tsCR1 Überexpression war jedoch nicht detektierbar (3.3.2. und Abbildung 42B). Schon in den *in vitro* Versuchen mit dem Doppeltransgenkonstrukt zeigte sich immer eine geringere Expression von tsCR1, welches nach dem 2A-Element liegt. Obwohl das Enzym EndoGalC zur Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope führen sollte und demnach auch bei fehlender tsCR1-Expression zur Reduktion der Zelllyse durch NHS führen sollte, zeigte sich nur ein geringer Effekt (3.3.2. und Abbildung 42C). Die Ursachen könnten darin gelegen haben, dass das 2A Element im Ferkel 9833 nicht vollständig funktionell war. Im Falle der EndoGalC-Expression könnte die nachgewiesene 26,58-fache Überexpression der EndoGalC mRNA (gegenüber der EndoGalC mRNA vom Geschwistertier) im Tiermodell nicht ausreichend gewesen sein, um als sezerniertes Protein einen nachweisbaren Effekt auf die  $\alpha$ gal Epitope zu erzielen. Daraus lässt sich schließen, dass unter Umständen mehrere aktive Virusintegranen pro transgenem Ferkel notwendig sind, um eine Steigerung der Effekte ähnlich wie in der Zellkultur bei Steigerung der Virusmenge von 200ng auf 600ng RT zu erreichen. Zusätzlich müssen auch die natürlichen Schwankungen zwischen den Tieren berücksichtigt werden. Dies war besonders deutlich am  $\alpha$ GT mRNA level zu sehen: Das transgene Ferkel 9833 trug keine shRNA und sollte somit keine reduzierten  $\alpha$ GT mRNA level aufweisen. Allerdings variierte dieser Wert zwischen dem transgenen Ferkel 9833 und seinem nicht transgenen Geschwistertier 9835 sehr stark ( $62,44\% \pm 1,03$  vs. 100%, 3.3.2. und Abbildung 43). Jedoch sollte von diesem einen positiv-transgenen Ferkel 9833 mit geringem funktionellem Ergebnis nicht auf die Gesamtheit des Erfolges der Methodik geschlossen werden. Dafür müssen sich weitere Untersuchungen und insbesondere Analysen weiterer positiv-transgener Ferkel anschließen.

#### 4.5. Ausblick in die Zukunft

Immer noch warten rund 12.000 Bundesbürger in Deutschland auf ein Spenderorgan. Deshalb wurde im Mai 2012 die Organspende neu geregelt. Zum einen soll in regelmäßigen Abständen jeder Bürger über 16 Jahre von den Krankenkassen über Neuerungen in der Organspende informiert werden, um eine Entscheidung für oder gegen die Organspende zu erleichtern. Zum anderen erhält die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO), welche die Organspende deutschlandweit koordiniert, durch eine Änderung des Transplantationsgesetzes Unterstützung durch Transplantationsbeauftragte welche Organtransplantationen durchführen. (<http://www.welt.de/politik/deutschland/>

article106378240/Organspende-wird-neugeregelt-Zweifel-bleiben.html). Doch ob und wie schnell diese Maßnahmen zu einer Erhöhung der Anzahl benötigter Organe führen sind noch ungewiss. Deshalb sind alle Bemühungen in der Forschung weiterhin von großer Bedeutung, vor allem bei Organen die nicht durch eine Lebendspende ersetzt werden können (Beispiel Herz und Lunge). Die Nutzung des Hausschweines mit den großen physiologischen Gemeinsamkeiten zum Menschen, jahrzehntelangen Zuchterfolgen und weitverbreiteten Zuchtanlagen bietet eine gute Grundlage für die Generierung transgener Schweine für die Xenotransplantation. Der stabile Knockdown von Genen mittels shRNA codierenden lentiviralen Vektoren wurde bereits vielfach in der Literatur beschrieben (Rubinson *et al* 2003, Tiscornia *et al* 2003, Stewart *et al* 2003, Pfeifer *et al* 2006, Dieckhoff *et al* 2007, Hofmann *et al* 2004, Rubinson *et al* 2003), ebenso die Nutzung lentiviraler Vektoren zur Überexpression von Transgenen (Miyoshi *et al* 1997, Hofmann *et al* 2003, Petersen *et al* 2009, Mulley *et al* 2006, Plege *et al* 2010). Die Funktionalität lentiviraler Vektoren mit einer Kombination aus shRNA für den Knockdown der  $\alpha$ GT und der Transgene tsCR1 und EndoGalC für die Überexpression porcinen Zellen konnte erstmals in dieser Arbeit aufgezeigt werden. Die Vektoren zeigten hierbei gute Ergebnisse bei den *in vitro* Experimenten, jedoch müssten die auftauchenden *in vivo* Probleme wie etwa die geringe Anzahl an Trächtigkeiten, die geringe Anzahl Ferkel pro Wurf oder die geringe Anzahl positiv-transgener Ferkel durch weiterführende Experimente noch beseitigt werden. Um die Generierung multitransgener Schweine für die Xenotransplantation zu beschleunigen, ist die Verwendung von bereits gezüchteten GGAT<sup>-/-</sup> Knockout Schweinen (Niemann und Kues 2003) und möglichst vieler Transgenintegration zur Verzögerung und Minimierung der Abstoßungsreaktion unerlässlich (Ekser *et al* 2011 und 2012, Mc Gregor *et al* 2011, Le Bas-Bernhardet *et al* 2011). Einzig problematisch bleibt aufgrund der komplett fehlenden  $\alpha$ gal Epitope die mangelnde Erkennung der durch Schweinezellen gebildeten Retroviren durch das menschliche Immunsystem (Dieckhoff *et al* 2008, Mattiuzzo *et al* 2008, Ramsoondar *et al* 2009, Denner und Tönjes 2012). Aus diesem Grund stellt die Knockdown Methode mittels shRNA eine vielversprechende Alternative dar: die gebildeten porcinen Retroviren werden durch minimale  $\alpha$ gal Epitopreste gerade noch vom menschlichen Immunsystem erkannt, die Suppression der Immunantwort verhindert jedoch gerade noch die akute Abstoßungsreaktion des transplantierten Organes. Zusätzlich könnte eine zielgerichtete Virusgenomintegration in transkriptionell aktive Genombereiche der Wirtszelle ohne Beeinflussung des Stoffwechsels die Effektivität der Generierung transgener Schweine steigern und die Entwicklungszeit hin zu ersten Transplantationsversuchen verkürzen.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit die grundsätzliche Funktionalität lentiviraler multitransgener Vektoren zur Generierung von Schweinen als Xenotransplantationsmodell gezeigt werden und weiterführende Ansätze könnten in der Zukunft dem Mangel an Spenderorganen entgegenwirken.

## 5. Zusammenfassung

Aufgrund der weltweiten Knappheit an Spenderorganen für die Transplantation war das Ziel dieser Dissertation die Entwicklung von multitransgenen Schweinen als Transplantationsmodell.

Die lentiviralen Vektoren wurden wegen der stabilen Integration ins Wirtszellgenom und damit einhergehender stabiler Expression der Gene verwendet. Die klonierten lentiviralen Vektoren, welche für verschiedene shRNA Sequenzen codierten, waren durch stabile Integration ins Wirtszellgenom in der Lage, die  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase mRNA und damit die  $\alpha$ gal Epitope auf den Zelloberflächen von Schweinehautzellen zu reduzieren. Dies konnte nach Transduktion sowohl in PSF-Mischpopulationen als auch in generierten Zellklonen gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Einhaltung bereits publizierter Regeln zum Design von siRNA zu einem effizienten Knockdown führt. Auch die Lage der Orientierung der shRNA-Kassette im lentiviralen Vektor und der verwendete Promoter zeigte einen wesentlichen Einfluß auf die Reduktion des mRNA levels des Zielgens in den transduzierten Zellen.

Die zusätzliche Kombination der shRNA codierenden lentiviralen Vektoren mit der Überexpression der Transgene EndoGalC (Endogalaktosidase C; Reduktion der  $\alpha$ gal Epitope) oder tsCR1 (trunkierte lösliche Form des Complement Rezeptors 1; Reduktion der Zelllyse durch humanes Komplement) bedingte *in vitro* eine Verstärkung der shRNA-basierenden Silencing Effekte. Die *in vitro* Applikation multitransgener lentiviraler Vektoren mittels der durch das 2A Element verbundenen Transgene EndoGalC und tsCR1 zeigte eine Überexpression und Funktionalität des ersten Transgenes, EndoGalC. Die Überexpression und Funktionalität des zweiten Transgenes tsCR1 lag selbst bei maximal verwendeter Virusmenge von 600ng RT deutlich unter den Expressionsraten von EndoGalC.

Parallel zu den *in vitro* Experimenten wurden transgene Schweine durch subzonale Injektion von Lentiviren in befruchtete Oocyten oder Kerntransfer von lentiviral transduzierten Zellkernen in kernlose Oocyten und jeweils anschließend Embryonaltransfer generiert. Insgesamt konnten aufgrund sehr geringer Erfolgsquoten nur drei transgene Ferkel erzeugt werden mit unterschiedlichem Genotyp (U6-shRNA9, PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9, PGK-EndoGalC-2A-tsCR1). Nur bei einem Ferkel (9833, PGK-EndoGalC-2A-tsCR1) zeigte sich in der methylierungssensitiven Southern Blot Analyse keine Provirusmethylierung und damit potentiell vorhandene transkriptionelle Aktivität der Transgenkassette. Die funktionellen

Analysen isolierter Zellen zeigten trotz meßbarer Überexpression der EndoGalC mRNA keine tsCR1 Überexpression und keinen messbaren Schutz der porcinen Zellen vor Zelllyse in Gegenwart von humanen Serum (NHS).

Weiterführende *in vitro* Experimente zur Erhöhung der Transgenüberexpression und weitere *in vivo* Versuche zur Erzeugung von multitransgenen Ferkeln mit gleichzeitiger shRNA-Expression mit mehrfachen viralen Integranten sind notwendig, um potentiell geeignete Organe für die Xenotransplantation zu erzeugen. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen jedoch, dass die Grundsteine für die Entwicklung der multitransgenen Schweine bereits gelegt werden konnten.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit 18 verschiedene shRNAs kloniert, von denen 13 eine 19bp lange siRNA, 4 eine 21bp lange siRNA und eine shRNA eine 27bp lange siRNA aufwiesen. Von den shRNAs wurden 13 selbst entwickelt, 4 über Firmen synthetisiert und eine shRNA wurde als Kontrolle von Zhu *et al* (2005) verwendet. Zur Austestung der shRNAs wurde neben dem H1 Promoter hauptsächlich der U6 Promoter verwendet. Unter Verwendung des U6-shRNA9 Virusvektors wurden 38 Zellklone generiert, von denen 5 durch Transduktion mit 25ng Virus-RT, 10 durch Transduktion mit 50ng Virus-RT, 18 durch Transduktion mit 200ng Virus-RT und 6 durch Transduktion mit 600ng Virus-RT entstanden. Insgesamt wurden 20 subzonale Injektionen mit anschließendem Embryonaltransfer zur Generierung transgener Schweine durchgeführt. Davon konnten 6 Trächtigkeiten erzielt werden, von denen 5 erfolgreich beendet wurden. 27 Ferkel wurden über diese Methode geboren, von denen 18 überlebten. Nur 2 der Ferkel wiesen einen Virusintegranten auf, welcher durch Methylierung des Genomes transkriptionell inaktiv war. Zusätzlich wurden 7 Kerntransfere mit anschließendem Embryonaltransfer zur Generierung transgener Schweine durchgeführt. Hier konnten 5 Trächtigkeiten erzielt werden, von denen eine erfolgreich beendet wurde und 2 vorzeitig gezielt abgebrochen wurden. Unter den 10 Ferkeln bzw. Feten wurde ein Ferkel mit einem transkriptionell aktiven Virusintegranten EndoGalC-2A-tsCR1 detektiert.

## 6. Anhang

### 6.1. Sequenzen

#### 6.1.1. $\alpha$ GT cDNA

```

1      GCGCAGGGCT CCGGGGCCCC TCCCTGCAGT ACTGGGTGAT AGACCCCACT CCACCCTCCG
61     GGTCCCTCCA CCCCCACCAC GTGCAGGCCA GAGAAGGCAA AGAGGCCCAG CCACCCTCAC
121    CAGGGAATTT CTTTTCTTTT TTTGCTGGTT TCAGGCTTTT TTCTGCCTGA GTGAAAATGA
181    AACAAACACC CCCTGCGCCT CCCGGCCACC AGACACACAC GCGCACCGGC ACTCGCGCAC
241    TCGCGCCCTC GGCCTCCTAG CGGCCGTGTC TGGGGCGGGA CCCGCTCTGC ACAAACAGCC
301    GCGGGCCGGG TGGAGCGGGG AGCTCGCCGC CCCCGCCCCA GTGCCCGCCG GCTTCCTCGC
361    GCCCCTGCCC GCCACCCCGG AGGAGCACAC AGCGGCCGGC GGGCCGGAGC GCAGGCGGCA
421    CACCCCGCCC CGGCACGCCC TGCCGAGCTC AGGAGCACGC CGCGCGCCAC GTTTCCTCA
481    GCCGAGGACG CCGCCGGGGG GCCGGGAGCC GAGGTGTGGG CCATCCCCGA GCGCACCCAG
541    CTTCTGCCGA TCAGGAGTTG GAACGCAGCA CCTTCCCTTC CTCCAGCCC TGCTCCTTC
601    TGCAGAGCAG AGCTCACTAG AACTTGTTTC GCCTTTTACT CTGGGGGGAG AGAAGCAGAG
661    GATGAGGAGA AAATAATGAA TGTCAAAGGA AGAGTGGTTC TGTCAATGCT GCTTGTCTCA
721    ACTGTAATGG TTGTGTTTTG GGAATACATC AACAGCCCAG AAGGTTCCTT GTTCTGGATA
781    TACCAGTCAA AAAACCCAGA AGTTGGCAGC AGTGCTCAGA GGGGCTGGTG GTTTCGAGC
841    TGGTTTAACA ATGGGACTCA CAGTTACCAC GAAGAAGAAG ACGCTATAGG CAACGAAAAG
901    GAACAAAGAA AAGAAGACAA CAGAGGAGAG CTTCCGCTAG TGGACTGGTT TAATCCTGAG
961    AAACGCCCAG AGGTCGTGAC CATAACCAGA TGGAAGGCTC CAGTGGTATG GGAAGGCACT
1021   TACAACAGAG CCGTCTTAGA TAATTATTAT GCCAAACAGA AAATTACCGT GGGCTTGACG
1081   GTTTTTGCTG TCGGAAGATA CATTGAGCAT TACTTGAGG AGTTCTTAAT ATCTGCAAAAT
1141   ACATACTTCA TGGTTGGCCA CAAAGTCATC TTTTACATCA TGGTGGATGA TATCTCCAGG
1201   ATGCCTTTGA TAGAGCTGGG TCCTCTGCGT TCCTTTAAAG TGTTTGAGAT CAAGTCCGAG
1261   AAGAGGTGGC AAGACATCAG CATGATGCGC ATGAAGACCA TCGGGGAGCA CATCTGGCC
1321   CACATCCAGC ACGAGGTGGA CTTCTCTTTC TGCATGGACG TGGATCAGGT CTTCCAAAAC
1381   AACTTTGGGG TGGAGACCCT GGGCCAGTCG GTGGCTCAGC TACAGGCCTG GTGGTACAAG
1441   GCACATCCTG ACGAGTTCAC CTACGAGAGG CGGAAGGAGT CCGCAGCCTA CATTCCGTTT
1501   GGCCAGGGGG ATTTTTATTA CCACGCAGCC ATTTTTGGGG GAACACCCAC TCAGGTTCTA
1561   AACATCACTC AGGAGTGCTT CAAGGGAATC CTCCAGGACA AGGAAAATGA CATAGAAGCC
1621   GAGTGGCATG ATGAAAGCCA TCTAAACAAG TATTTCTTTC TCAACAAACC CACTAAAATC
1681   TTATCCCCAG AATACTGCTG GGATTATCAT ATAGGCATGT CTGTGGATAT TAGGATTGTC
1741   AAGATAGCTT GGCAGAAAAA AGAGTATAAT TTGGTTAGAA ATAACATCTG ACTTTAAATT
1801   GTGCCAGCAG TTTTCTGAAT TTGAAAGAGT ATTACTCTGG CTACTTCTCC AGAGAAGTAG
1861   CACCTAATTT TAACTTTTAA AAAAATACTA ACAAATAACC AACACAGTAA GTACATATTA
1921   TTCTTCCTTG CAACTTTGAG CTTGTCAAAA TGGGGGAATG ACTCTGTGGT AATCAGATGT
1981   AAATTCCTCA TGATTTCTTA TCTGTTCTGG GTTGAGGGGG TATATACTAT TAACTGAACC
2041   AAAAAAAAAA TTGTCATAGG CAAAGAAAAA GTCAGAGACA CTCTACATGT CATACTGGAG
2101   AAAAGTATGC AAAGGGAAGT GTTTGGCAAC AAAATAAGAT TGGGAGGGGT CGTCCTCTTG
2161   ATTTTAGCGT CTTCTGTCT CTGCTAAGTC TAAAGCAACA GAGTTGCTTT GCAGCAGGAG
2221   ATCAGAGTCT ACCTTAGCAA TCCTCAGATG ATTTCAACAG CAGAGGACTT CAGGTTATTT
2281   GAAGTCCATG TCCTTTTCGC ATCAGGGTTT TGTTTGCTT CTGCGCAGGA TACTGATCAA
2341   GATTCCCAAT GTGAATGTTG GAGTTACAGG GAATCCGAAT GAACCAATGG GAGCTCAGCA
2401   CGAAATAAAA GCACAGCTTC TAAGTAAGTT TGCCATGAAG TAGCGAAGAC AGATTGGAAG
2461   GAGAGGGGGC TGATCACTGT GGGGCAATGC CATTTCTAAG AGACACAGGG CATGGAGTTG
2521   GCATGTACAT ACAGCTTGGA TCCAGGCACT GAATGGGAGG CAATGAGAGT GGCTCCAGCC
2581   TCCTCAACCA TATGACAAC AGAGCAGCAC TGTCTTAGAA GATGCTTCTT GCTTTGGCCA
2641   AGTCATATTC AGTCTGCCAG ACTCTGGAAC TTGTGTCTAC AAATCCTTGC TCAGAGGAAG
2701   TGGATGATGT CAGAGTGGAC AGAGGCCTAC ATTGGGTTGA AGTGACTTCC TAGACCTTGG
2761   CTTCATGACA ATCAGGCATC AGCAAGCCCT GCTGCCACCT GCTCTAACTC TCAGAGTCCC
2821   TCAGCCCATC ATGGGCAACT TGAGAGCCAC CGTCAAGGAG TGGACTAGAG GAAAAGCCTG
2881   CTTATCAGGG AACCTCTCAT TTCCCCTGCC CCAGCTGCAC TACTGAAGTG TAACTGCCGG
2941   ACATGTTTAA TAAAGTGGTT AATTGATTTT ATATCAAAGT AGAGAGGATG GCAATGGGAG
3001   ACCCAGTCCT CATGACTAAA CAGCTTTTCA ATCCCTTTCT CTAAGAAAAA CTATGAGATC

```



```

3061   TTACATGTAA   TTTAAAGTTA   AGCAGTTTGG   TGTAAGAGGAA   GTTAGGAGGC   AATATTTACA
3121   TCTGCAGGTA   TGTGATATAC   TTTTGCTTGT   GTTCCAGTTT   AGGTCATTTG   TGTCCATTTT
3181   CAAATGATTT   ACTTGAAGAG   CCATTGCACT   GACTTGATGT   TCAGCACGAT   GGGCTTCTTT
3241   GATAAAATGA   AACCTACATT   TTCTCTACTG   TTTCCCTGGG   CCTCCTACTC   TTCAATTCTT
3301   GCTAAAAATT   TTTGCAACCC   AGCAAAATAA   CTCAACAAAA   TAACCCAACA   AAATAACTCA
3361   ACAAAAATCC   TGGAGAAGTA   GTCTTGTAAG   AGAAAAAGGA   AATCACAAGT   CAATTAGGAC
3421   TCTTGTTTCT   CTATAACGCA   AGTTTATGGA   ATCCATTCTG   GAGTGCAGAG   ACTTCATGGT
3481   GCAAGTTCCA   AACTACAGAA   ATGATTTCGT   CTCAAAGATT   AAAGAAAAGG   ACTGATATTT
3541   CCTTTTGAAG   GAATCTTGAT   TTTTAAAAAA   AAAATCATTT   AAATTTAAAT   TTCAAATGGA
3601   CAAATTCAAG   ATCTTATTAA   TAGTTCAATA   TTAAAAATA   AAAATTCCTG   ATTTAAAAAT
3661   AAATAAATTA   TTTTCTCAGT   ATAT

```

#### Sequenz *Sus scrofa* $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase ( $\alpha$ GT).

Quelle: PubMed Sequenz AF221508, 3684 bp.

### 6.1.2. tsCR1 cDNA

```

1      ATGGGGGCCT   CTTCTCCAAG   AAGCCCGGAG   CCTGTCGGGC   CGCCGGCGCC   CGGTCTCCCC
61     TTCTGCTGCG   GAGGATCCCT   GCTGGCGGTT   GTGGTGCTGC   TTGCGCTGCC   GGTGGCCTGG
121    GGTCAATGCA   ATGCCCCAGA   ATGGCTTCCA   TTTGCCAGGC   CTACCAACCT   AACTGATGAA
181    TTTGAGTTTC   CCATTGGGAC   ATATCTGAAC   TATGAATGCC   GCCCTGGTTA   TTCCGGAAGA
241    CCGTTTTCTA   TCATCTGCCT   AAAAACTCA   GTCTGGACTG   GTGCTAAGGA   CAGGTGCAGA
301    CGTAAATCAT   GTCGTAATCC   TCCAGATCCT   GTGAATGGCA   TGGTGCATGT   GATCAAAGGC
361    ATCCAGTTCG   GATCCCAAAT   TAAATATTCT   TGTACTAAAG   GATACCGACT   CATTGGTTCC
421    TCGTCTGCCA   CATGCATCAT   CTCAGGTGAT   ACTGTCATTT   GGGATAATGA   AACACCTATT
481    TGTGACAGAA   TTCCTTGTGG   GCTACCCCCC   ACCATCACCA   ATGGAGATTT   CATTAGCACC
541    AACAGAGAGA   ATTTTCTACTA   TGGATCAGTG   GTGACCTACC   GCTGCAATCC   TGGAAAGCGGA
601    GGGAGAAAGG   TGTTTGAGCT   TGTGGGTGAG   CCCTCCATAT   ACTGCACCAG   CAATGACGAT
661    CAAGTGGGCA   TCTGGAGCGG   CCCC GCCCCT   CAGTGCATTA   TACCTAACAA   ATGCACGCCT
721    CCAAATGTGG   AAAATGGAAT   ATTGGTATCT   GACAACAGAA   GCTTATTTTC   CTTAAATGAA
781    GTTGTTGAGT   TTAGGTGTCA   GCCTGGCTTT   TGCATGAAAG   GACCCGCGCG   TGTGAAGTGC
841    CAGGCCCTGA   ACAAATGGGA   GCCGGAGCTA   CCAAGCTGCT   CCAGGGTATG   TCAGCCACCT
901    CCAGATGTCC   TGCATGCTGA   GCGTACCCAA   AGGGACAAGG   ACAACTTTTC   ACCTGGGCAG
961    GAAGTGTTCT   ACAGCTGTGA   GCCC GGCTAC   GACCTCAGAG   GGGCTGCGTC   TATGCGCTGC
1021   ACACCCCAGG   GAGACTGGAG   CCCTGCAGCC   CCCACATGTG   AAGTGAAATC   CTGTGATGAC
1081   TTCATGGGCC   AACTTCTTAA   TGGCCGTGTG   CTATTTCCAG   TAAATCTCCA   GCTTGAGACA
1141   AAAGTGGATT   TTGTTTGTGA   TGAAGGATTT   CAATTAAGAG   GCAGCTCTGC   TAGTTACTGT
1201   GTCTTGGCTG   GAATGGAAAG   CCTTTGGAAT   AGCAGTGTTT   CAGTGTGTGA   ACAAATCTTT
1261   TGTCCAAGTC   CTCCAGTTAT   TCCTAATGGG   AGACACACAG   GAAAACCTCT   GGAAGTCTTT
1321   CCCTTTGGGA   AAACAGTAAA   TTACACATGC   GACCCCCACC   CAGACAGAGG   GACGAGCTTC
1381   GACCTCATTG   GAGAGAGCAC   CATCCGCTGC   ACAAGTGACC   CTCAAGGGAA   TGGGGTTTGG
1441   AGCAGCCCTG   CCCCTCGCTG   TGGAATTCTG   GGTCACTGTC   AAGCCCCAGA   TCATTTTCTG
1501   TTTGCCAAGT   TGAAAACCCA   AACCAATGCA   TCTGACTTTC   CCATTGGGAC   ATCTTTAAAG
1561   TACGAATGCC   GTCCTGAGTA   CTACGGGAGG   CCATTCTCTA   TCACATGTCT   AGATAACCTG
1621   GTCTGGTCAA   GTCCCAAAGA   TGTCTGTAAA   CGTAAATCAT   GTAAAACTCC   TCCAGATCCA
1681   GTGAATGGCA   TGGTGCATGT   GATCACAGAC   ATCCAGGTTG   GATCCAGAAAT   CAACTATTCT
1741   TGTACTACAG   GGCACCGACT   CATTGGTCAC   TCATCTGCTG   AATGTATCCT   CTCGGGCAAT
1801   GCTGCCCATT   GGAGCACGAA   GCCGCCAATT   TGTCAACGAA   TTCCTTGTGG   GCTACCCCCC
1861   ACCATCGCCA   ATGGAGATTT   CATTAGCACC   AACAGAGAGA   ATTTTCACTA   TGGATCAGTG
1921   GTGACCTACC   GCTGCAATCC   TGGAAGCGGA   GGGAGAAAGG   TGTTTGAGCT   TGTGGGTGAG
1981   CCCTCCATAT   ACTGCACCAG   CAATGACGAT   CAAGTGGGCA   TCTGGAGCGG   CCCGGCCCCC
2041   CAGTGCATTA   TACCTAACAA   ATGCACGCCT   CCAAATGTGG   AAAATGGAAT   ATTGGTATCT
2101   GACAACAGAA   GCTTATTTTC   CTTAAATGAA   GTTGTGGAGT   TTAGGTGTCA   GCCTGGCTTT
2161   GTCATGAAAG   GACCCCGCCG   TGTGAAGTGC   CAGGCCCTGA   ACAAATGGGA   GCCGGAGCTA
2221   CCAAGCTGCT   CCAGGGTATG   TCAGCCACCT   CCAGATGTCC   TGCATGCTGA   GCGTACCCAA
2281   AGGGACAAGG   ACAACTTTTC   ACCCGGGGGA   TCCACTAGCT AG

```

#### Sequenz der trunkierten Form des löslichen Komplementrezeptors 1 (tsCR1) vom Start bis Stop Codon (nach Chernajovsky *et al* 2000).

Quelle: Pubmed Sequenz sCR1 NM\_000561, Darstellung, 2322bp.

## 6.1.3. EndoGalC cDNA

```

1      ATGAATGTCA AAGGAAGAGT GGTTCGTGCA ATGCTGCTTG TCTCAACTGT AATGGTTGTG
61     TTTTGGGAAT ACATCAACAG CCCAGAAGGT TCTTTGTTCT GGATATACCA GTCAAAAAAAC
121    CCAGAAGTTG GCAGCAGTGC TCAGAGGGGC TGGTGGTTTC CGAGCTGGTT TAACAATGGG
181    ACTCACAGTT ACCACGAAGA AGAAGACGCT ATAGGCAACG AAAAGGAACA AAGAAAAAGAA
241    GACAACAGAG GAGAGCTTCC GCTAGTGGAC TGGTTTAATC CTGATGAGAA TGAATATGTA
301    CTTACAAATG TATTAAATGG CTTAATACCT ACTACTAATA GTAAACATAT GATTATTAGT
361    GGGCATTCTA CTGTACCACA AGTATCAATA TTACATCCAG ATTCAGCAAC TGATGGAGAT
421    AATTCATCTA GTAATGATGA TAGTTTAAAT ACTAAAGTTA TAGTTGGAGA AGAAACAGGA
481    GGATTAGATA ATGGTTATAG TAAATGGGAA CCTGTTTTTC TACAATATGA TTTAAAAAAA
541    ATTCGTCCAG TAAAAGAAAT CAAAATTTAT AGAAATACTT ATGATAATGC AATACCAACA
601    TTCAAAGATG TAAAAGTAGA ATTATCAACT AGTCCAAATT TTGAAAAAGA TAATACATCT
661    GTTGTGTTTG AAAAGCAAGA TATTATTGAA AGTAGAGAAA GCAAAGGTAA TCCTCAAAAT
721    ATAAGTTTAG ATAAAGCTAT TGATGCTCAA TATATCCGAA TTTGGGGAAA GGGACATTAT
781    ATTGAAAATA CCAATAGTTC ATGGAAGGA TATAGCAATG GAAATCTTTA TAATGAAATA
841    GAAGTTATGG CTAATGTTCC AAAGTCTGAA GTACCAAGTC AGCCAGACAA TATTCAGCCT
901    AGAAATCTAG CAAGTGGAAG GCTTCCGTAT GTTTATGGAT TAGAGCCAAG TAATATAGAA
961    GCAATTACAG ATGGAAAAAT AGATGATAAT TATGCTGTAC ACAATAGTAT GGGAAATAAC
1021   TGGCTTCAAT TTGAATATAA AAATACTTAT AAATTTAATA GTATAAAGTT TAAATTAGAA
1081   CCAGGGAAGT ATAAATCTGT TAAAGTAGCT ATTTCTAATT CTCCAAACAA TGGATTTAAA
1141   GAGGTTTTTTA GTAAATAAAA TTGGACACAA AATAATGATT TAGAAGTAAT AAATTTACCT
1201   TCTAATACTA AAGGCAGATA TATTCGTTTT ACAATTGATA AAGATGGAAA GAGTAAAAACA
1261   AAATATTCTG AGATTGAAAT ATGGGGAACA GGAAATAATT ATGATGAAAG TAAAGATGAG
1321   TACGTTGAAC CACAATCCAA ATATAATGAA CTTGTTTGGA GTGACGAGTT TAATGGTGAA
1381   AAAATAGATG AGAATAAATG GACTATTATA GATGGAATGG TTAACCATGG TGCAATCTAT
1441   AATAGGGGAG CAGTAAGCAT AAAAAAGGAT GGCAATAATA GCTATTTAGC AATAAACACT
1501   AAAAAGTTTA ATAGCACAGA AGAATTAATT AAGGCTGTTG GAGTAGATAA TTATTTAGGA
1561   CAAAGTATAA ATAAACAAAA AGTTACTTGG TCATCTGGAA GAATTGAATC AAAAAATAAA
1621   TATTCTTTTC AATTTGGACG TATGGCAGTA AGGGCAAAAG TAAATGATTC TCAAGGAATT
1681   TGGCCAGCAA TATGGATGTT ATCTCAAGAT GAAACAGGCC ATGATGAAAT AGATGTTTTA
1741   GAATATTTAG GACAAGATCC TTGGGGTGCA TGGACAACAT ATCATTTTGG AATATTAGGA
1801   AAAAAATAAG CTTCTAATGG AATTAGAAAT AGTAATTATG AGGCTTGGAG TCAAGATTTT
1861   CATGTCTTTG AAGTTGAATG GGATCCAGAA TTTATAAAAT GGTATATAGA TGGAAAGGAA
1921   GTATTTCAAA GTACTCAAGG AAGAGATGAT GGCAGAGATG GTATGCATAC TAGACCTATG
1981   TTCCCAATAT TAGAGACACA AGTTGGAGAT GGTGGGTTG GTGATGTTGA TTATAATAAG
2041   CAAAATACAA AGCAAAATTC AGATTATTTA ATTGATTGGA TAAGAGTATA TCAAATGCCT
2101   AATCAAGCAA ATGTAAATTT TGATGATTTA AGAAGTCTTG ATAAGAAAGA AAATAAAGGA
2161   TATGAAGTAA CTCCTTATTC TCATACAAAT AATTTAATAA AATTATCAGA TGGAGATTTA
2221   AATGAAGAAA ACAAGGATAA TTTTACTAT GGGGGTCAAC CTAGATTAGA AAATAATCGT
2281   ATAGCTGTTG GAGAAAATGG AGGTAGAGAA TCTATAATTT ATAATGTTAC TAATGTTAAA
2341   GATATACATT TAACTACTTA CTATCAAAC ATTGAAGATA AAATCACATG GAATAGAAGT
2401   GCAGGTGCAT ATGAAGGATA TTCAATTAGA TCATCATTA TAAGTGGTAA TATAGATTTT
2461   AAATTATTTA CATCAGATGA CGGAGAAATT TGAATGAAG TTAGAAATGT AAAAAAGTA
2521   GATAATTTTG TAGAAAAACA TCCAGGATAT GCCAGAACAA CATTTGATGC TTATAATTTA
2581   CCAAAGAATA CTCAATTTAT AAAAATTGAA TTTCCACAAT ATAAAAATGT AAAATATAGA
2641   TTAAATAGTG GGGCTATAAA AGATGTGAAA AATACTGATA TTCAATTAGC TAAAGTAACT
2701   TTTTACAAA ATAAATTAA

```

**Sequenz der fusionierten Form der Endo- $\beta$ -galactosidase C von *Clostridium perfringens* mit dem Golgi-Lokalisationssignal der  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase (EndoGalC) vom Start bis Stop Codon (nach Ogawa *et al* 2002).**

Quelle: PubMed Sequenz AB038772 (*Clostridium perfringens*), Exon 4-7 von AF221508 (*Sus Scrofa*), 2718 bp.

### 6.1.4. FE2A cDNA

```

1      AGATCTCTGC AGAAAATCGA TCGCGCAAAG CGACAGTGTA CTAATTATGC TCTCTTGAAA
      TCTAGAGACG TCTTTTAGCT AGCGCGTTTC GCTGTCACAT GATTAATACG AGAGAACTTT
61     TTGGCTGGCG ATGTTGAGAG CAACCCTGGG CCGGGATCCG TCGACGCGGC CGC
      AACCGACCGC TACAACTCTC GTTGGGACCC GGCCCTAGGC AGCTGCGCCG GCG

```

**20aa lange Sequenz des *Equine rhinitis A virus* (E2A) fusioniert mit dem Spaltungssignal für das Enzym Furin (F, Furin cleavage Site).**

Quelle: nach Donnelly *et al* 2001 und de Felipe 2004.

## 6.2. Tabellen

**Tabelle 15**

**Auflistung der 18 verschiedenen siRNA Sequenzen für die Klonierung der U6-shRNA lentiviralen Konstrukte.**

siRNA	Sense Strang 5'-3'	Länge (bp)	Bindungsstelle $\alpha$ GT cDNA (bp)	Exon $\alpha$ GT	Reynolds Kriterien	Sekundärstruktur	kcal/mol	%GC
1	CGAAAAGGAACAAAGAAAA	19	894-912	7	ja	ja	2	31,6
2	GAAGATACATTGAGCATT	19	1094-1112	8/9	ja	ja	3,5	32,0
2-27	AGATACATTGAGCATTACTTGGAGGAG	27	1096-1122	8/9	ja	ja	5,2	33,3
3	CTTAATATCTGCAAATACA	19	1125-1143	9	ja	ja	-1	26,3
4	GTATTCCTTCTCAACAAA	19	1650-1668	4	ja	ja	0,5	31,6
5	AATGAATGTCAAAGGAAGA	19	675-693	4	ja	ja	-1,8	31,6
6	GGAGAAAATAATGAATGTCAA	21	666-686	4	ja	ja	3,7	28,6
7	CCAGAATACTGCTGGGATTAT	21	1687-1707	9	ja	ja	6,5	42,9
8	ATAATGAATGTCAAAGGAA	19	673-691	4	ja	nein	4,8	23,8
9	CAGAATACTGCTGGGATTATC	21	1688-1708	9	ja	nein	-1,2	42,9
10	GAATACTGCTGGGATTATCAT	21	1690-1710	9	ja	ja	-0,6	38,1
11	AAGATACATTGAGCATTAC	19	895-913	9	ja	nein	0,6	28,6
12	GAGATCAAGTCCGAGAAGA	19	1246-1264	9	ja	nein	-1,3	47,4
13	CTGCTGGGATTATCATATA	19	945-963	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
14	CTGGTTTAATCCTGAGAAA	19	1695-1713	7/8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
16	GAGAAGAGGTGGCAAGACA	19	1258-1276	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	CAAGATAGCTTGGCAGAAA	19	1740-1758	9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
20	GAAGAAGACGCTATAGGCA	19	874-892	7	n.d.	ja	-2	47,4

Die Klonierung aller shRNAs erfolgte in antisense-loop-sense Orientierung (ass). Die siRNA 12 wurde zusätzlich in der Orientierung sense-loop-antisense (sas) als shRNA19 kloniert. Das Terminationssignal war bei allen shRNAs TTTT. Die Loopsequenz war bei allen shRNAs TTCAAGAGA, eine Ausnahme bildeten die shRNA11 und 12 mit der Loopsequenz CCACACC (2.3.). Die shRNA1-12 wurden nach Kriterien wie in der Arbeit beschrieben designt und durch die Firma MWG Eurofins Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die shRNA13-14 wurden durch die Firma B-Bridge (Heidelberg) und die shRNA 16-17 durch die Firma EuroGenTech (Köln) jeweils nach deren Algorithmen designt und synthetisiert. Die shRNA20 stammte von Zhu *et al.* Die zugrundeliegende cDNA Sequenz der *Sus scrofa*  $\alpha$ -1,3-Galaktosyltransferase Klon A stammte aus der GenBank Accession No. AF221508 (6.1.1.). Die kcal/mol Werte und die Sekundärstrukturen wurden unter Zuhilfenahme des antisense Stranges ermittelt, die %GC Werte und die Reynolds Kriterien wurden unter Zuhilfenahme des sense Stranges ermittelt.

**Tabelle 16****Auflistung aller 38 generierten Zellklone mit mind. einem U6-shRNA9 Virusintegranten.**

ng RT	Zellklon	Integranten	% $\alpha$ GT mRNA	SEM	% $\alpha$ gal Epitope	SEM
25	25-20	1	17,23	2,00	n.d.	n.d.
	25-24	3	21,04	3,07	n.d.	n.d.
	25-31	1	24,61	2,24	n.d.	n.d.
	25-48	1	22,67	2,41	n.d.	n.d.
	25-67	1	102,99	16,03	n.d.	n.d.
50	50-11	2	40,40	4,13	n.d.	n.d.
	50-21	1	20,79	3,26	n.d.	n.d.
	50-23	1	25,35	4,60	n.d.	n.d.
	50-27	1	105,06	26,72	n.d.	n.d.
	50-34	2	11,68	1,20	n.d.	n.d.
	50-37	1	41,12	7,09	n.d.	n.d.
	50-39	1	32,50	4,16	n.d.	n.d.
	50-54	1	72,43	7,01	n.d.	n.d.
	50-57	1	57,33	17,83	n.d.	n.d.
	50-73	1	38,76	3,45	n.d.	n.d.
200	200-4	1	51,61	2,24	92,04	17,54
	200-5	1	20,26	0,69	55,85	7,33
	200-10	1	24,13	1,09	n.d.	n.d.
	200-12	2	36,90	4,62	61,13	10,57
	200-14	3	5,30	0,42	n.d.	n.d.
	200-15	1	46,47	4,78	n.d.	n.d.
	200-19	2	8,54	0,66	34,38	3,21
	200-21	2	17,85	1,26	n.d.	n.d.
	200-23	4	8,96	0,38	n.d.	n.d.
	200-24	3	13,92	0,93	33,33	6,03
	200-25	1	17,53	8,15	32,01	5,39
	200-29	1	20,40	1,75	53,94	4,22
	200-32	1	23,41	1,17	n.d.	n.d.
	200-38	3	60,38	9,43	n.d.	n.d.
	200-39	4	15,79	2,90	n.d.	n.d.
	200-40	1	12,70	1,47	45,11	3,69
	200-41	1	29,37	2,58	81,22	6,43
	200-42	4	14,16	0,49	9,58	1,87
600	600-117	2	15,27	1,77	50,22	5,86
	600-126	4	5,90	0,57	14,14	2,02
	600-135	6	8,21	1,92	n.d.	n.d.
	600-158	2	25,31	4,05	n.d.	n.d.
	600-166	1	66,46	7,25	91,87	n.d.
	600-124	0	88,07	8,63	103,60	10,27

PSF Wildtypzellen wurden mit 25ng RT, 50ng RT, 200ng RT bzw. 600ng RT des lentiviralen Konstruktes U6-shRNA9 infiziert und Zellklone generiert (2.10.1.). Die Zellklone wurden mittels Southern Blot Analyse (2.10.10.) auf die Anzahl der Virusintegranten hin untersucht. Per Real-Time PCR (2.10.4.) wurden die  $\alpha$ GT mRNA Level und per Durchflusszytometrie (2.11.2.) die  $\alpha$ gal Epitopmengen bestimmt.

**Tabelle 17****Auflistung aller durchgeführten Subzonalen Injektionen.**

Nr	injiziertes Viruskonstrukt	Datum SI	transferierte Embryonen	Mutttertier	Trächtigkeit	Geburt	Ferkel Anzahl	Ferkel Nummer
1	U6-shRNA20	27.03.2006	n.d.	443	ja*			
2	U6-shRNA9	10.04.2006	n.d.	444	nein			
3	U6-shRNA9	24.04.2006	n.d.	445	nein			
4	U6-shRNA9	26.06.2006	38	446	ja	15.10.2006	7	9538-9542
5	U6-shRNA9	10.07.2006	61	447	nein			
6	U6-shRNA9	04.09.2006	28	448	nein			
7	U6-shRNA9	04.09.2006	25	449	nein			
8	U6-shRNA9	11.09.2006	73	450	nein			
9	U6-shRNA9	25.09.2006	n.d.	451	nein			
10	PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	18.06.2007	4	#				
11	PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	02.07.2007	3	#				
12	LTR-U6-shRNA9	17.09.2007	31	471	nein			
13	LTR-U6-shRNA9	17.12.2007	3	#				
14	PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	28.01.2008	65	478	ja	19.05.2008	4	9687-9690
15	PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	28.01.2008	64	479	ja	19.05.2008	5	9691-9695
16	LTR-U6-shRNA9	25.02.2008	185	481	ja	17.06.2008	9	9696-9704
17	PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	25.03.2008	48	482	nein			
18	PGK-EndoGalC-2A-tsCR1	22.09.2008	41	483	nein			
19	PGK-EndoGalC-2A-tsCR1	22.09.2008	41	484	ja	16.01.2009	2	9795-9796
20	PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9	10.11.2008	71	485	nein			

Anzahl Trächtigkeiten	6
davon erfolgreich beendet	5
Anzahl Ferkel	27

\* Die Trächtigkeit konnte nicht erfolgreich beendet werden (Ababort). # Durch die zu geringe Anzahl gewonnener Embryonen nach subzonaler Injektion (SI) wurde kein Embryonaltransfer (ET) in ein Mutttertier durchgeführt.

**Tabelle 18****Auflistung aller durchgeführten Kerntransfers.**

Nr	transduziertes Viruskonstrukt	ng RT	Datum ET	transferierte Embryonen	Mutttertier	Trächtigkeit	Geburt	gezielter Abbruch	Ferkel Anzahl	Ferkel Nummer
1	PGK-EndoGalC-2A-tsCR1	1x600	07.11.2008	n.d.	NT28	ja	03.03.2009		4	9832-9835
2	PGK-EndoGalC-2A-tsCR1	1x600	07.11.2008	n.d.	n.d.	nein				
3	PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9	3x600	23.01.2009	86	n.d.	ja*				
4	PGK-EndoGalC-LTR-U6-shRNA9	3x600	23.01.2009	86	n.d.	nein				
5	PGK-tsCR1-LTR-U6-shRNA9	3x600	13.02.2009	89	n.d.	ja		06.04.2009	2	F1-F2
6	PGK-EndoGalC-LTR-H1-shRNA9	3x600	20.03.2009	n.d.	n.d.	ja*				
7	PGK-EndoGalC-LTR-H1-shRNA9	3x600	20.03.2009	n.d.	NT 47	ja		08.06.2009	4	F1-F4

Anzahl Trächtigkeiten	5
davon erfolgreich beendet	3
Anzahl Ferkel	10

\* Die Trächtigkeit konnte nicht erfolgreich beendet werden (Ababort). Die PSF Wildtypzellen wurden einmal bzw. dreimal mit 600ng RT des lentiviralen Viruskonstruktes transduziert (2.9.3.) und zum Nukleustransfer (Kerntransfer) der AG Wolf übergeben (2.12.).

**Tabelle 19**  
**Auflistung aller verwendeten Primer für Klonierungen.**

Primer Name	Sequenz 5'-3'	Template	Tm (°C)	PCR Fragment (bp)
Primer für Southern Blot Sonden				
Gag_forDiana	TCGACGCAGGACTCGGCTT	Hplm	55	516
Gag_revDiana	AATTCACTTCTCCAATTGTCCC		51	
U6-9 fw	TCTAGGTCGGGCAGGAAGAG	Hplm-U6-shRNA9	56	402
U6-9 rev	CTCGAGGTCGACGGTATCGA		56	
Primer für Northern Blot Sonden				
N-Sonde si9Gal	GATAATCCCAGCAGTATTCTG	-		21
Primer für H1-shRNA Klonierung				
H1-BspEI fw	ATATTCCGGA GAATTCGAAC GCTGACGTCA T	Hplm-H1	52	340
shRNA-BspEI_rev	ATATTCCGGA GTCGACGGTA TCGATAAGCT T		52	
H1-XbaI fw	AACCTCTAGAGAACGCTGACGTCATCAACCC	Hplm-H1	54	340
H1-PstI_rev	AACCCTGCAGAAAAAGATAATCCCAGCAGTATTC		51	
H1-XhoI fw	AACCCTCGAGGAACGCTGACGTCATCAACCC	Hplm-H1	54	340
H1-Acc65II rev	AACCGGTACCAAAA AGATAATCCC AGCAGTATTC		51	
Primer für U6-shRNA Klonierung				
BamHI fw	CCGGGGATCCAAGGTCGGGCA	Hplm-U6	62	380
PstI rev	GCTTGCATGCCTGCAGGTCCTAG		61	
U6-siPst fw	CGAGCTGCAGCCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA	Hplm-U6	66	360
U6-siEcoRI rev	ATCCGAATTCGTCCTAGTAAAAAGCGGACCGAAGTCCGC		64	
U6-siXho fw	CGAGCTCGAGCCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTA	Hplm-U6	66	360
U6-siKpn rev	ATCCGGTACCGTCCTAGTAAAAAGCGGACCGAAGTCCGC		64	
Primer für EndoGalC Klonierung				
EndoBglII fw	AGAGAGATCTATGAATGTCAAAGGAA	pBS-EndoGal ΔStop-2A	47	2718
EndoStopSal rev	CTCTGTCGACTTATTTATTTGTAAAAAGTTACTTTAG		47	
Primer für tsCR1 Klonierung				
tsCR1BglII fw	GCATAGATCTATGGGGGCCTCTTCTCCAAGAAGC	MFG-tsCR1	61	2300
tsCR1pBSStopSal_rev	TGCCGTCGACCTAGCTAGTGGATCCCCGGGTGAA		63	
tsCR1-SalI rev	CTTCGTCGACGCTAGTGGATCCCCGGGTGAAAA	MFG-tsCR1	61	2300
tsCR1-AgeI fw	GAAGACCGGTATGGGGGCCTCTTCTCCAAGAAG		61	

Alle Primer (0,01μmol, HPSF gereinigt) wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

Tabelle 20

Auflistung aller verwendeten Real-Time PCR, SYBR-Green PCR und Semiquantitativer PCR Primer.

Primer Name	Sequenz 5'-3'	Template	5' Fluorophor	Tm (°C)	PCR Fragment (bp)
<b>Primer für Real Time PCR</b>					
actinTaq_fw	TCCTTCCTGGGCATGGAATC				
actinTaq_rev	TGTTGGCGTAGAGGTCCTTG				
actinTaq_probe	ACCTTCAACTCCATCATGAAGTGCGACG		Texas Red		
galTaq_fw	ACGAGTTCACCTACGAGAG				
galTaq_rev	GGTAATAAAAATCCCCCTGGC				
galTaq_probe	AGTCCGCAGCCTACATTCCGTT		Fam		
EndoGalC_fw	CAAGGAAGAGATGATGGCAG				
EndoGalC_rev	ATCAACATCACCACCCAAC				
EndoGalC-Probe	CCTATGTTCCCAATATTAG AGACACAAGTTGGAGA		Hex		
sCR1_fw	AGCTCTGCTAGTTACTGTGTC				
sCR1_rev	GTTTTCTGTGTGTCTCCC				
sCR1-Probe	CCAGTGTGTGAACAAATCTTTGTCCAAGTCC		Cy5		
ppt-U6Taq_fw	TTAAAAGAAAAGGGGGGATTGG				
ppt-U6Taq_rev	TCTCTCTAACAGCCTTGTATCG				
ppt-U6Taq	AGGGCCTATTTCCTATGATTCTCTCA		Fam		
Tag_fw	ACTCTCAACATTCTACTCTCTCC				
Tag_rev	GTGGTGTAATAGCAAAGCAAG				
Tag_probe	AGACCCCAAGGACTTTCCTTCAGA		Fam		
<b>Primer für SYBR-Green PCR</b>					
EndoSeq899_fw	CCAGACAATATT CAGCCTAGAA				149
EndoSYBR_revNEU (1049)	CAAATTGAAG CCAGTTATTTC				
tsCR1_fwPCR	AATCTCCAGCTTGGAGCAAA				136
tsCR1SYBR1239_rev	AAGATTGTTCACACACTGGA				
actinTaq_fw	TCCTTCCTGGGCATGGAATC				271
actinTaq_rev	TGTTGGCGTAGAGGTCCTTG				
<b>Primer für Semiquantitative PCR</b>					
ACTINs_fw	AAGAGAGGCATCCTGACCCT	Aktin <i>Sus scrofa</i> AY550069		52	217
ACTINs_rev	TACATGGCTGGGGTGTGAA			52	
actinpig_fw	GTGCGGACATCAAGGAGAA	Aktin <i>Sus scrofa</i> AY550069		54	240
actinpig_rev	TGTCGACGTCGCACTTCAT			54	
GT_fw	ATGAATGTCAAAGGAAGAGTG	$\alpha$ GT <i>Sus scrofa</i> AF221509		49	445, 410, 347, 242
GT1_rev	CCTCCAAGTAATGCTCAATG			50	
GT2_for	AGCAGAGCTCACTAGAAGCTT	$\alpha$ GT <i>Sus scrofa</i> AF221509		55	
GT2_rev	TCAGATGTTATTCTAACCA			55	
GT3_fw	TGGTTGGCCACAAAGTCATC	$\alpha$ GT <i>Sus scrofa</i> AF221509		55	481
GT3_rev	ATCATTGCCACTCGGCTTCT			55	
tsCR1_fwPCR	AATCTCCAGCTTGGAGCAAA	tsCR1 Vektoren		50	671
tsCR1_revPCR2	GAGAGGATACATTGAGCAGA			50	
EndoSeq899_fw	CCAGACAATATTGAGCCTAGAA	EndoGalC Vektoren		51	149
EndoSYBR_revNeu	CAAATTGAAGCCAGTTATTTC			50	

Alle Primer wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Actin\_fw und actin\_rev stammen aus Zhu *et al* 2005. Die Primer und Sonden wurden wie folgt gereinigt und markiert: *Taq*-Man Primer (0,01  $\mu$ mol, HPSF gereinigt), *Taq*-Man-Sonde (0,05  $\mu$ mol, HPLC gereinigt; mit 3' Modifikation BHQ1 (Black hole quencher 1) und 5' Modifikation Fluorophor).

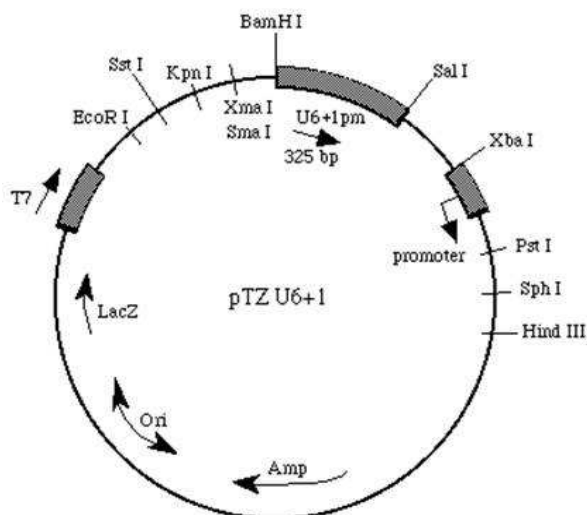
**Tabelle 21****Auflistung aller verwendeten Sequenzierprimer.**

Primer Name	Sequenz 5'-3'	Template
H1-Seq fw	CCTGCAATATTTGCATGTCG	H1 Promoter
U6+1seq fw	CGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTC	U6 Promoter
U6+1seq rev	TAAGTTGGGTAAACGCCAGGG	U6 Promoter
U6 fw	CCCGGGGATCCAAGGTCGGG	U6 Promoter
3LTR rev	ATCAGCGGGTTTAAACGGGC	Hplm
3LTR fw	GACAGCCGCCTAGCATTTCA	Hplm
Seq3LTR rev	CATCTAGGTGTCTAGTTCCTATAG	Hplm
HplmLTR 2Arev	TGAATTAGCCCTTCCAGTCC	Hplm
Hplmppt 2A fw	GAATAGTAGACATAATAGCAACAG	Hplm
pBS 2Arev	AACGACGGCCAGTGAGCGCG	pBS
pBS 2Afw	CACACAGGAAACAGCTATGAC	pBS
pBS rev	CACACCTTAACACTCGCCTA	pBS
PGK fw	CGGTGTTCCGCATTCTGCAA	PGK Promoter
SilencerU6 fw	TTACATGATAGGCTTGGATT	pSilencer1.0-U6
EndoSeq899 fw	CCAGACAATATTCAGCCTAGAA	EndoGalC
EndoSeq1841 fw	GGTGCATGGACAATAATCA	EndoGalC
Scr1seq fw	GTGTCAGCCTGGCTTTGTCAT	tsCR1
Scr1seq rev	CTGGCAAATGGAAGCCATTCTG	tsCR1
tsCR1 fw	GCAGGAAGTGTCTACAGCT	tsCR1

Alle Primer (0,01µmol, HPSF gereinigt) wurden durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

### 6.3. Plasmidkarten

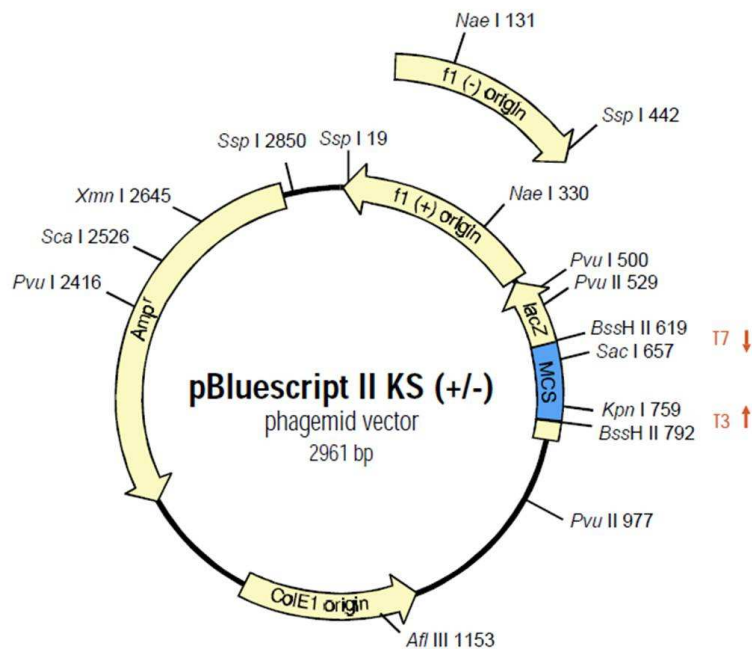
#### 6.3.1. pTZU6+1



Das Plasmid stammte von Dr. J.J. Rossi Laboratory, Beckman Research Institute, City of Hope, California.

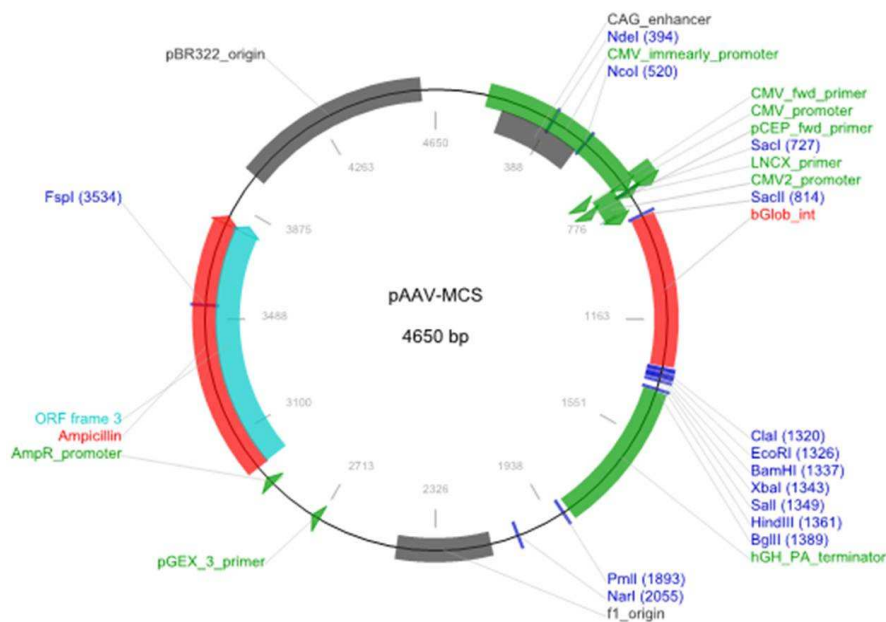


### 6.3.2. pBluescript



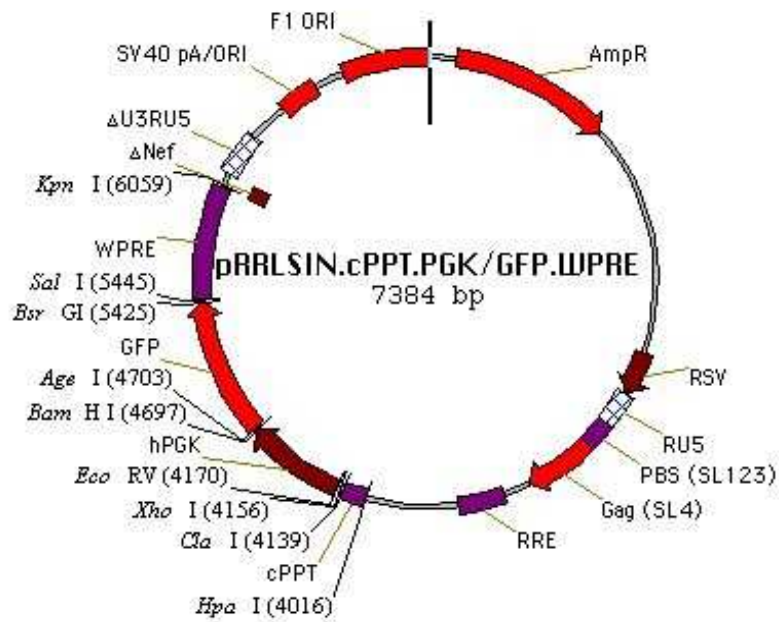
Das Plasmid stammt von Stratagene (bzw. Agilent Technologies, Waldbronn).

### 6.3.3. MTD-pAAV-MCS



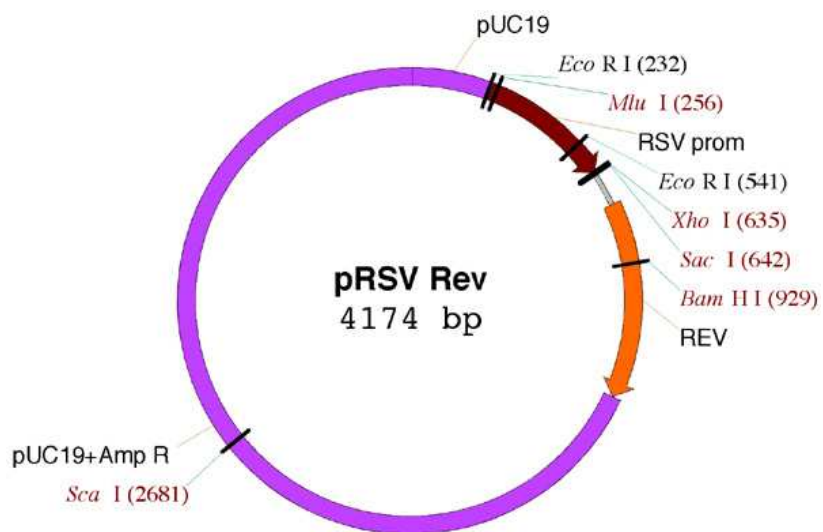
Modifiziert nach <http://addgene.org/vector-database/1642/>.

### 6.3.4. pRRL.SIN-18



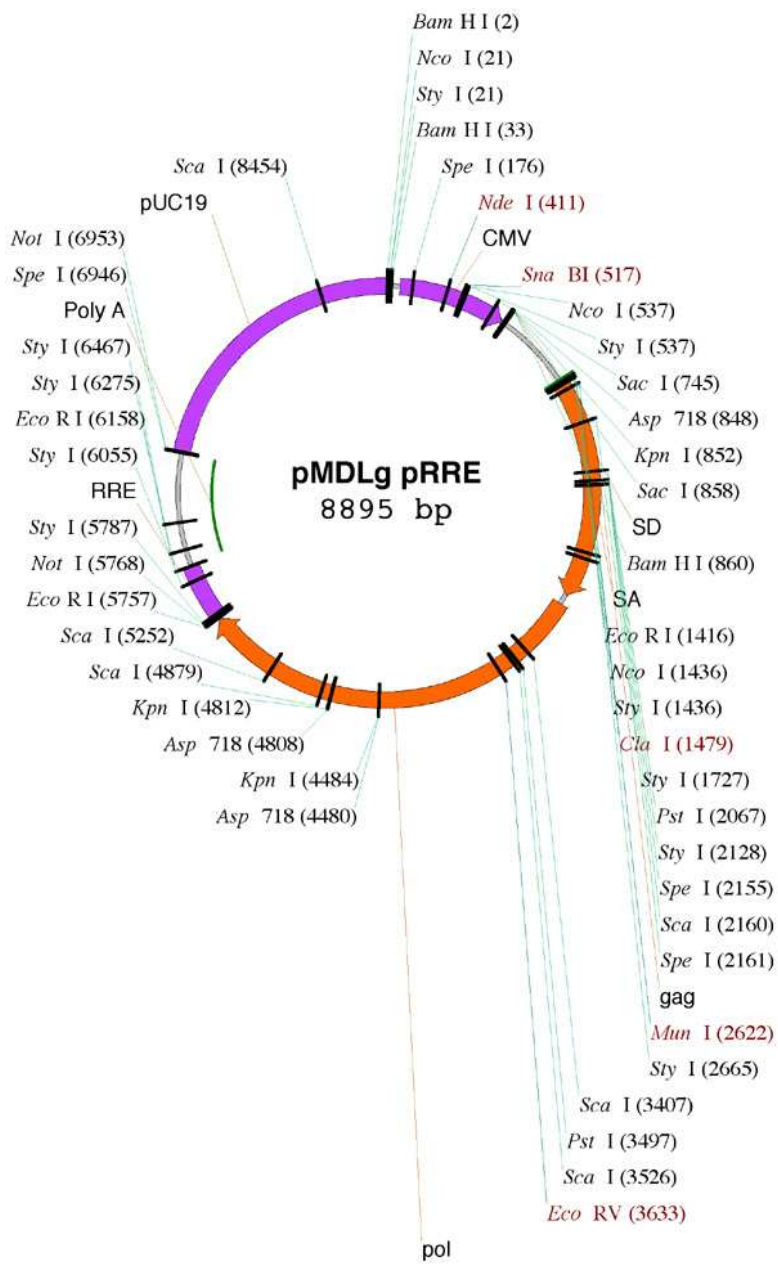
Modifiziert nach <http://www.medecine.unige.ch/~salmon/lvpu/>.

### 6.3.5. pRSV Rev



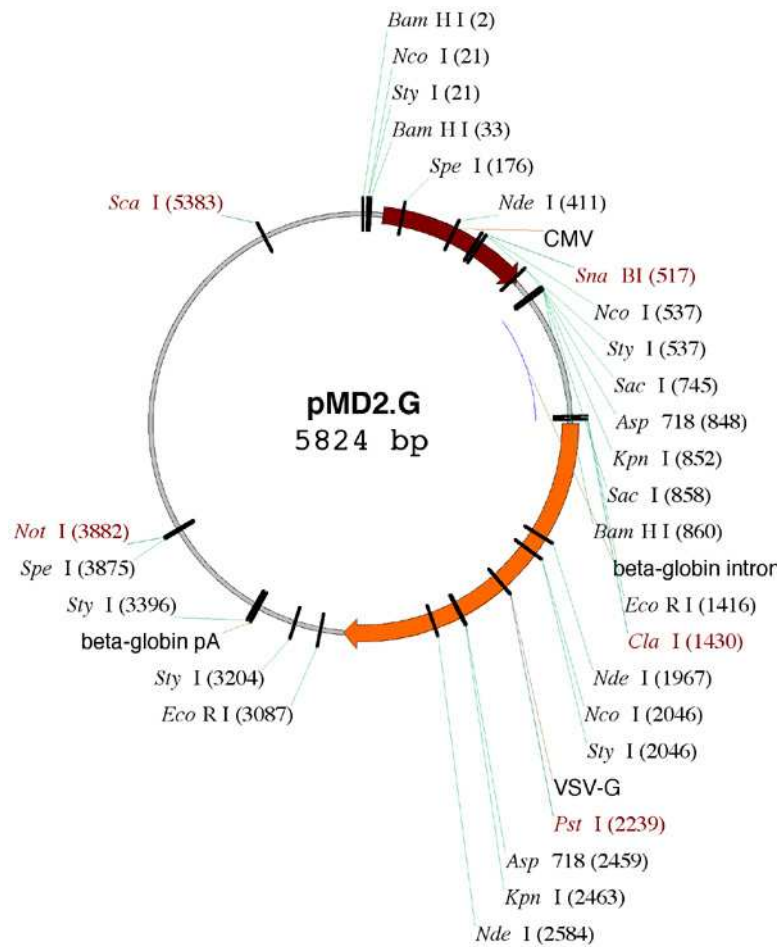
Modifiziert nach <http://www.addgene.org/12253/>.

## 6.3.6. pMDLg/pRRE



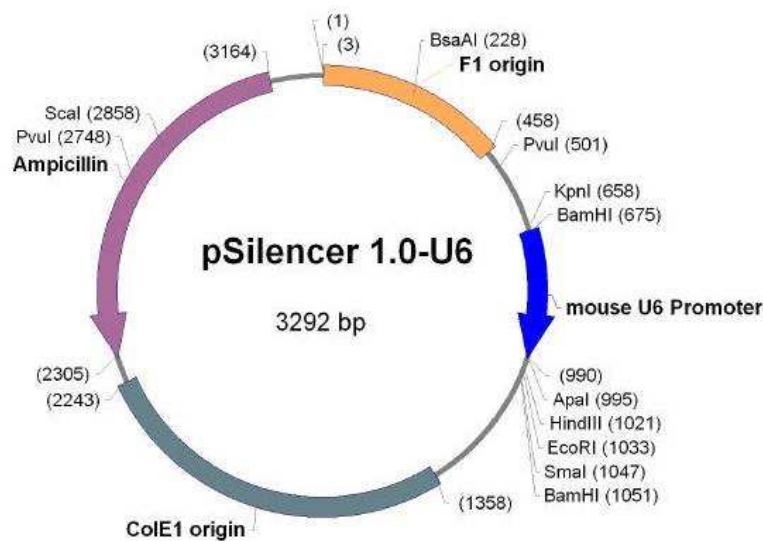
Modifiziert nach <http://www.addgene.org/12251/>.

## 6.3.7. pMD2.G



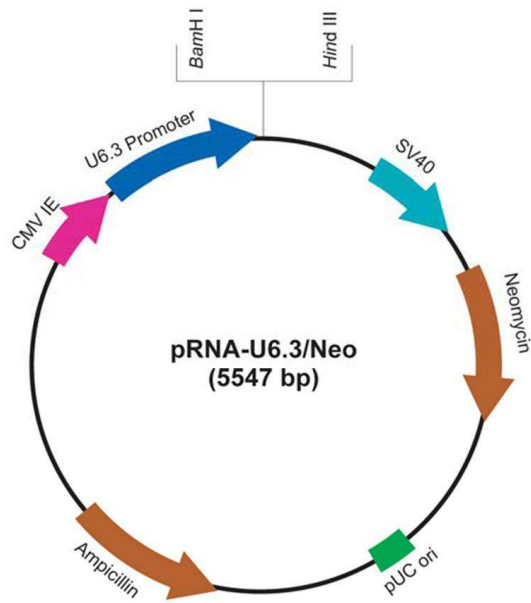
Modifiziert nach <http://www.addgene.org/12259/>.

## 6.3.8. pSilencer 1.0-U6



Das Plasmid stammte von Ambion (bzw. life technologies, Darmstadt).

## 6.3.9. pRNA-U6.3/Neo



Das Plasmid stammte von GenScript (USA).

## 7. Literaturverzeichnis

- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK. (2003) RNAi: Biology, mechanism and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.*;67(4):657-85.
- Aigner B, Renner S, Kessler B, Klymiuk N, Kurome M, Wünsch A, Wolf E. (2010) Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl).*;88(7):653-64
- Aiken C. (1997) Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J Virol* 71:5871-5877.
- Akkina RK et al. (1996) High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G. *J Virol* 70: 2581-2585.
- An DS, Qin FX, Auyeung VC, Mao SH, Kung SK, Baltimore D, Chen IS. (2006) Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol Ther.*;14(4):494-504.
- Ashida H, Anderson K, Nakayama J, Maskos K, Chou CW, Cole RB, Li SC, Li YT. (2001) A novel endo-beta-galactosidase from *Clostridium perfringens* that liberates the disaccharide GlcNAc $\alpha$ 1-->Gal from glycans specifically expressed in the gastric gland mucous cell-type mucin. *J Biol Chem.*;276(30):28226-32
- Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* ;220(4599):868-71.
- Bauer A, Renz V, Baschnegger H, Abicht JM, Beiras-Fernandez A, Brenner P, Thein E, Schmoekel M, Reichart B, Christ F. (2011) Microcirculatory alterations after orthotopic pig-to-baboon heart transplantation. *Xenotransplantation.*;18(4):232-8
- Bauer A, Postrach J, Thormann M, Blanck S, Faber C, Wintersperger B, Michel S, Abicht JM, Christ F, Schmitz C, Schmoekel M, Reichart B, Brenner P. (2010) First experience with heterotopic thoracic pig-to-baboon cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation.*;17(3):243-9.
- Berger EA et al. (1999) Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol* 17: 657-700.
- Berglund JA et al. (1997) A high affinity binding site for the HIV-1 nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* 25: 1042-1049.
- Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Ramratnam B(2004) Efficient Gene Transfer of HIV-1-Specific Short Hairpin RNA into Human Lymphocytic Cells Using Recombinant Adeno-associated Virus Vectors. *Molecular Therapy* 9, 396–402; doi: 10.1016/j.ymthe.2003.11.025
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.*;296(5567):550-3.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK.(1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1;90(17):8033-7.
- Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R.(2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;106(1):157-62.
- Chernajovsky Y, Dreja H, Annenkov A. (2000) Soluble complement receptor 1 (CD35) delivered by retrovirally infected syngeneic cells or by naked DNA injection prevents the progression of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*;43(8):1698-709.
- Chinnasamy D, Milsom MD, Shaffer J, Neuenfeldt J, Shaaban AF, Margison GP, Fairbairn LJ, Chinnasamy N. (2006) Multicistronic lentiviral vectors containing the FMDV 2A cleavage factor demonstrate robust expression of encoded genes at limiting MOI. *Virol J.*;3:14.
- Chinnasamy D, Chinnasamy N, Enriquez MJ, Otsu M, Morgan RA, Candotti F. (2000) Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood*;96(4):1309-16.
- Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Jeong SH, Lee JI, Oh BC, Kang HJ, Wee WR. (2011) Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*;52(9):6643-50
- Cibrián-Jaramillo A, Martienssen RA.(2009) Darwin's "Abominable Mystery": the role of RNA interference in the evolution of flowering plants. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;74:267-73. Epub 2010 May 27
- Clever JL et al. (2000) A heterologous, high-affinity RNA ligand for human immunodeficiency virus Gag protein has RNA packaging activity. *J Virol* 74: 541-546.
- Coffin JM. (1990) Retroviridae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM (eds) *Virology*, 2nd edn. Raven Press, New York, pp 1437-1500.
- Coffin JM. (1992) Structure and classification of retroviruses. In: Levy J (ed) *The Retroviridae*, Vol 1. Plenum

- Press, New York, pp 19-50.
- Cullen BR. (1991) Regulation of HIV-1 gene expression. *FASEB J.* ;5(10):2361-8. Review.
- Dai, Y., Vaught, T. D., Boone, J., Chen, S. H., Phelps, C. J., Ball, S., Monahan, J. A., Jobst, P. M., McCreath, K. J., Lamborn, A. E., et al. (2002). Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20, 251-255.
- De Cock KM. Epidemiology and the emergence of human immunodeficiency virus and a acquired immune deficiency syndrome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Jun 29;356(1410):795-8.
- de Felipe P, Izquierdo M. (2003) Construction and characterization of pentacistronic retrovirus vectors. *J Gen Virol.*;84(Pt 5):1281-5.
- de Felipe P. (2004) Skipping the co-expression problem: the new 2A "CHYSEL" technology. *Genet Vaccines Ther.*;2(1):13.
- Delenda C. (2004) Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6 Suppl 1: S125-138.
- Denner J, Tönjes RR. (2012) Infection barriers to successful xenotransplantation focusing on porcine endogenous retroviruses. *Clin Microbiol Rev.*;25(2):318-43.
- Dieckhoff B, Petersen B, Kues WA, Kurth R, Niemann H, Denner J. (2008) Knockdown of porcine endogenous retrovirus (PERV) expression by PERV-specific shRNA in transgenic pigs. *Xenotransplantation.*;15(1):36-45
- Dieckhoff B, Karlas A, Hofmann A, Kues WA, Petersen B, Pfeifer A, Niemann H, Kurth R, Denner J. (2007) Inhibition of porcine endogenous retroviruses (PERVs) in primary porcine cells by RNA interference using lentiviral vectors. *Arch Virol.*;152(3):629-34.
- Doms RW and Moore JP. (2000) HIV-1 membrane fusion: targets of opportunity. *J Cell Biol* 151: F9-14.
- Donnelly ML, Hughes LE, Luke G, Mendoza H, ten Dam E, Gani D, Ryan MD. (2001) The 'cleavage' activities of foot-and-mouth disease virus 2A site-directed mutants and naturally occurring '2A-like' sequences. *J Gen Virol.*;82(Pt 5):1027-41.
- Doolittle RF, Feng DF, McClure MA, Johnson MS (1990) Retrovirus phylogeny and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol.*;157:1-18.
- Dull T et al. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463-8471.
- Dykxhoorn DM, Lieberman J. (2005) The silent revolution: RNAi as basic biology, research tool, and therapeutic. *Annu Rev Med.*;56:401-23
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;4(6):457-67.
- Ekser B, Rigotti P, Gridelli B, Cooper DK. (2009) Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model. *Transpl Immunol.*;21(2):87-92.
- Ekser B, Klein E, He J, Stolz DB, Echeverri GJ, Long C, Lin CC, Ezzelarab M, Hara H, Veroux M, Ayares D, Cooper DK, Gridelli B. (2012) Genetically-engineered pig-to-baboon liver xenotransplantation: histopathology of xenografts and native organs. *PLoS One.*;7(1):e29720
- Ekser B, Gridelli B, Veroux M, Cooper DK. (2011) Clinical pig liver xenotransplantation: how far do we have to go? *Xenotransplantation.*;18(3):158-67
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Ellis J and Yao S. (2005) Retrovirus silencing and vector design: relevance to normal and cancer stem cells? *Curr Gene Ther* 5: 367-373.
- Emi N, Friedmann T, Yee JK. (1991) Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol*; 65(3):1202-7.
- Ezzelarab M, Ekser B, Gridelli B, Iwase H, Ayares D, Cooper DK. (2011) Thrombocytopenia after pig-to-baboon liver xenotransplantation: where do platelets go? *Xenotransplantation.*;18(6):320-7.
- Fang J, Qian JJ, Yi S, Harding TC, Tu GH, VanRoey M, Jooss K (2005) Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol.*;23(5):584-90
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.*;391(6669):806-11.
- Fischer-Lougheed JY, Tarantal AF, Shulkin I, Mitsuhashi N, Kohn DB, Lee CC, Kearns-Jonker M. (2007) Gene therapy to inhibit xenoantibody production using lentiviral vectors in non-human primates. *Gene Ther.*;14(1):49-57
- Follenzi A et al. (2000) Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25: 217-222.
- Gallo RC and Montagnier L. (1987) The chronology of AIDS research. *Nature* 326: 435-436
- Gasmi M et al. (1999) Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* 73: 1828-1834.
- Gaynor RB. (1995) Regulation of HIV-1 gene expression by the transactivator protein Tat. *Curr Top Microbiol Immunol.*;193:51-77

- Giraldo AM, Ball S, Bondioli KR. (2012) Production of transgenic and knockout pigs by somatic cell nuclear transfer. *Methods Mol Biol.*;885:105-23.
- Goff SP. (2007) Host factors exploited by retroviruses. *Nat Rev Microbiol.* (4):253-63.
- Gottlinger HG et al. (1989) Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5781-5785.
- Hara H, Campanile N, Tai HC, Long C, Ekser B, Yeh P, Welchons D, Ezzelarab M, Ayares D, Cooper DK. (2010) An in vitro model of pig liver xenotransplantation--pig complement is associated with reduced lysis of wild-type and genetically modified pig cells. *Xenotransplantation.*;17(5):370-8
- Harborth J, Elbashir SM, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Weber K, Tuschl T (2003) Sequence, Chemical, and Structural Variations of Small Interfering RNAs and Short Hairpin RNAs and the Effect on Mammalian Gene Silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 13(2):83-105
- Harrich D, Ulich C, Gaynor RB. (1996) A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription. *J Virol.*;70(6):4017-27.
- Hasegawa K, Cowan AB, Nakatsuji N, Suemori H (2007) Efficient multicistronic expression of a transgene in human embryonic stem cells. *Stem Cells.*;25(7):1707-12
- Heale, B.S., Soifer, H.S., Bowers, C., and Rossi, J.J. (2005) siRNA target site secondary structure predictions using local stable substructures. *Nucl. Acids Res.* 33:e30.
- Hofacker, I.L. (2003) Vienna RNA secondary structure server. *Nucl. Acids Res.* 31:3429-3431
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Weppert M, Vogg B, Ludwig H, Stojkovic M, Boelhauve M, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.*;4(11):1054-60
- Hofmann A, Zakhartchenko V, Weppert M, Sebald H, Wenigerkind H, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2004) Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol Reprod.*;71(2):405-9
- Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, Brem G, Wolf E, Pfeifer A. (2006) Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther.*;13(1):59-66
- Hope T, Pomerantz RJ. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein: a pivotal protein in the viral life cycle. *Curr Top Microbiol Immunol.*;193:91-105.
- Hutvagner G. (2005) Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett.*;579(26):5850-7
- Iwakuma T et al. (1999) Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology* 261: 120-132.
- Jabbar MA. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein: roles in virus release and CD4 downregulation. *Curr Top Microbiol Immunol.*;193:107-20
- Jacks T et al. (1988) Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* 331: 280-283.
- Jaenisch R and Mintz B. (1974) Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 1250-1254
- Jahner D et al. (1982) De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature* 298: 623-628.
- Jones PA and Takai D. (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293: 1068-1070.
- Kafri T et al. (2000) Lentiviral vectors: regulated gene expression. *Mol Ther* 1: 516-521.
- Kalajzic I, Stover ML, Liu P, Kalajzic Z, Rowe DW, Lichtler AC. (2001) Use of VSV-G pseudotyped retroviral vectors to target murine osteoprogenitor cells. *Virology.*;284(1):37-45.
- Kao SY et al. (1987) Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* 330: 489-493.
- Katayama, A., Ogawa, H., Kadomatsu, K., Kurosawa, N., Kobayashi, T., Kaneda, N., Uchimura, K., Yokoyama, I., Muramatsu, T., and Takagi, H. (1998). Porcine alpha-1,3-galactosyltransferase: full length cDNA cloning, genomic organization, and analysis of splicing variants. *Glycoconj J* 15, 583-589.
- Keir ME, Francisco LM, Sharpe AH. (2007) PD-1 and its ligands in T-cell immunity. *Curr Opin Immunol.*;19(3):309-14
- Kemter E, Lieke T, Kessler B, Kurome M, Wuensch A, Summerfield A, Ayares D, Nagashima H, Baars W, Schwinzer R, Wolf E. (2012) Human TNF-related apoptosis-inducing ligand-expressing dendritic cells from transgenic pigs attenuate human xenogeneic T cell responses. *Xenotransplantation.*;19(1):40-51.
- Kim VN et al. (1998) Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 72: 811-816.
- Kim, D. H., Behlke, M. A., Rose, S. D., Chang, M. S., Choi, S., and Rossi, J. J. (2005). Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy. *Nat Biotechnol* 23, 222-226.
- Klages N, Zufferey R, Trono D (2000) A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther.*;2(2):170-6.
- Klymiuk N, van Buerck L, Bähr A, Offers M, Kessler B, Wuensch A, Kurome M, Thormann M, Lochner K,



- Nagashima H, Herbach N, Wanke R, Seissler J, Wolf E. (2012) Xenografted Islet Cell Clusters From INSLEA29Y Transgenic Pigs Rescue Diabetes and Prevent Immune Rejection in Humanized Mice. Diabetes online, doi: 10.2337/db11-1325;
- Kotler M, Simm M, Zhao YS, Sova P, Chao W, Ohnonsa SF, Roller R, Krachmarov C, Potash MJ, Volsky DJ. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) protein Vif inhibits the activity of HIV-1 protease in bacteria and in vitro. *J Virol.*;71(8):5774-81.
- Laker C et al. (1998) Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* 72: 339-348.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., et al. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 295, 1089-1092.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, N. S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M. J., Ehsani, A., Salvaterra, P., and Rossi, J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol* 20, 500-505.
- Le Bas-Bernardet S, Tillou X, Poirier N, Dilek N, Chatelais M, Devallière J, Charreau B, Minault D, Hervouet J, Renaudin K, Crossan C, Scobie L, Cowan PJ, d'Apice AJ, Galli C, Cozzi E, Soulillou JP, Vanhove B, Blancho G (2011) Xenotransplantation of galactosyl-transferase knockout, CD55, CD59, CD39, and fucosyl-transferase transgenic pig kidneys into baboons. *Transplant Proc.*;43(9):3426-30.
- Lever AM et al. (2004) Lentiviral vectors. *J Biomed Sci* 11: 439-449.
- Levy DN, Refaeli Y, Weiner DB. (1995) The vpr regulatory gene of HIV. *Curr Top Microbiol Immunol.*;193:209-36
- Lin CC, Ezzelarab M, Shapiro R, Ekser B, Long C, Hara H, Echeverri G, Torres C, Watanabe H, Ayares D, Dorling A, Cooper DK. (2010) Recipient tissue factor expression is associated with consumptive coagulopathy in pig-to-primate kidney xenotransplantation. *Am J Transplant.*;10(7):1556-68.
- Liu D, Kobayashi T, Onishi A, Furusawa T, Iwamoto M, Suzuki S, Miwa Y, Nagasaka T, Maruyama S, Kadomatsu K, Uchida K, Nakao A (2007) Relation between human decay-accelerating factor (hDAF) expression in pig cells and inhibition of human serum anti-pig cytotoxicity: value of highly expressed hDAF for xenotransplantation. *Xenotransplantation.*;14(1):67-73
- Lois C et al. (2002) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295: 868-872.
- Lu K, Heng X, Summers MF. (2011) Structural determinants and mechanism of HIV-1 genome packaging. *J Mol Biol.*;410(4):609-33.
- Mäkinen PI, Koponen JK, Kärkkäinen AM, Malm TM, Pulkkinen KH, Koistinaho J, Turunen MP, Ylä-Herttuala S (2006) Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J Gene Med.*;8(4):433-41.
- Manzi L, Montañó R, Abad MJ, Arsenak M, Romano E, Taylor P (2006) Expression of human soluble complement receptor 1 by a pig endothelial cell line inhibits lysis by human serum. *Xenotransplantation.*;13(1):75-9.
- Marsh M, Helenius A. (2006) Virus entry: open sesame. *Cell*; 124(4):729-40.
- Mathews, D.H. (2005) Predicting a set of minimal free energy RNA secondary structures common to two sequences. *Bioinformatics* 21:2246-2253.
- Mathews, D.H., Disney, M.D., Childs, J.L., Schroeder, S.J., Zuker, M., and Turner, D.H. (2004) Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:7287-7292.
- Mattiuzzo G, Scobie L, Takeuchi Y. (2008) Strategies to enhance the safety profile of xenotransplantation: minimizing the risk of viral zoonoses. *Curr Opin Organ Transplant.*;13(2):184-8.
- McClure MO et al. (1988) Human immunodeficiency virus infection of CD4-bearing cells occurs by a pH-independent mechanism. *Embo J* 7: 513-518.
- McGregor CG, Ricci D, Miyagi N, Stalboerger PG, Du Z, Oehler EA, Tazelaar HD, Byrne GW. (2012) Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts. *Transplantation.*;93(7):686-92.
- Milland, J., Christiansen, D., Lazarus, B. D., Taylor, S. G., Xing, P. X., and Sandrin, M. S. (2006). The molecular basis for galalpha(1,3)gal expression in animals with a deletion of the alpha1,3galactosyltransferase gene. *J Immunol* 176, 2448-2454.
- Miyoshi H et al. (1998) Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol* 72: 8150-8157.
- Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM (1997) Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;94(19):10319-23.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. *Molekulare Virologie*3. Auflage, 2010, XVIII
- Mohiuddin MM, Corcoran PC, Singh AK, Azimzadeh A, Hoyt RF Jr, Thomas ML, Eckhaus MA, Seavey C, Ayares D, Pierson RN 3rd, Horvath KA. (2012) B-cell depletion extends the survival of

- GTKO.hCD46Tg pig heart xenografts in baboons for up to 8 months. *Am J Transplant.*;12(3):763-71
- Mulley WR, Wee JL, Christiansen D, Milland J, Ierino FL, Sandrin MS. (2006) Lentiviral expression of CTLA4Ig inhibits primed xenogeneic lymphocyte proliferation and cytokine responses. *Xenotransplantation.*;13(3):248-52
- Naldini L et al. (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.
- Naldini L. (1998) Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol.*;9(5):457-63
- Naldini L. (1999) In vivo gene delivery by lentiviral vectors. *Thromb Haemost.*;82(2):552-4.
- Nguyen BN, Azimzadeh AM, Schroeder C, Buddensick T, Zhang T, Laaris A, Cochrane M, Schuurman HJ, Sachs DH, Allan JS, Pierson RN 3rd. (2011) Absence of Gal epitope prolongs survival of swine lungs in an ex vivo model of hyperacute rejection. *Xenotransplantation.*;18(2):94-107
- Niemann H and Kues W. (2003) Progress in Xenotransplantation Research Employing Transgenic Pigs. *Tx Med* 15: 3-14.
- Niemann H and Kues WA. (2003) Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci* 79: 291-317.
- Niemann, H., Verhoeven, E., Wonigeit, K., Lorenz, R., Hecker, J., Schwinzer, R., Hauser, H., Kues, W. A., Halter, R., Lemme, E., et al. (2001). Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. *Transplantation* 72, 1898-1906.
- Ogawa H, Kobayashi T, Yokoyama I, Nagatani N, Mizuno M, Yoshida J, Kadomatsu K, Muramatsu H, Nakao A, Muramatsu T. (2002) Reduction of alpha-galactosyl xenoantigen by expression of endo-beta-galactosidase C in pig endothelial cells. *Xenotransplantation* ;9(4):290-6.
- Parkin NT et al. (1992) Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo. *J Virol* 66: 5147-5151.
- Petersen B, Ramackers W, Tiede A, Lucas-Hahn A, Herrmann D, Barg-Kues B, Schuettler W, Friedrich L, Schwinzer R, Winkler M, Niemann H. (2009) Pigs transgenic for human thrombomodulin have elevated production of activated protein C. *Xenotransplantation.*;16(6):486-95.
- Pfeifer A and Verma IM. (2001) Virus vectors and their application. In Howley PM, Knipe DM, Griffin D, Lamb RA, Martin A, Roizman B and Straus SE (eds.) *Fields Virology*, (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 469-491.
- Pfeifer A et al. (2002) Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 2140-2145.
- Pfeifer A, Eigenbrod S, Al-Khadra S, Hofmann A, Mitteregger G, Moser M, Bertsch U, Kretzschmar H. (2006) Lentivector-mediated RNAi efficiently suppresses prion protein and prolongs survival of scrapie-infected mice. *J Clin Invest.*;116(12):3204-10.
- Pfeifer A, Hofmann A (2009) Lentiviral transgenesis. *Methods Mol Biol* 530: 391-405)
- Phelps CJ, Ball SF, Vaught TD, Vance AM, Mendicino M, Monahan JA, Walters AH, Wells KD, Dandro AS, Ramsoondar JJ, Cooper DK, Ayares DL. (2009) Production and characterization of transgenic pigs expressing porcine CTLA4-Ig. *Xenotransplantation.*;16(6):477-85.
- Phelps, C. J., Koike, C., Vaught, T. D., Boone, J., Wells, K. D., Chen, S. H., Ball, S., Specht, S. M., Polejaeva, I. A., Monahan, J. A., et al. (2003). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299, 411-414.
- Plege A, Borns K, Beer L, Baars W, Klempnauer J, Schwinzer R. (2010) Downregulation of cytolytic activity of human effector cells by transgenic expression of human PD-ligand-1 on porcine target cells. *Transpl Int.*;23(12):1293-300
- Ramsoondar J, Vaught T, Ball S, Mendicino M, Monahan J, Jobst P, Vance A, Duncan J, Wells K, Ayares D. (2009) Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus small interfering RNAs. *Xenotransplantation.*;16(3):164-80.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A. (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol.*;22(3):326-30
- Rizzuto CD et al. (1998) A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280: 1949-1953.
- Rous P. (1911) Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. *JAMA*;56:198; *JAMA*. 1983 Sep 16;250(11):1445-9.
- Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Zhang M, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L. (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet.*;33(3):401-6.
- Saiki RK et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

- Salmon, P., Oberholzer, J., Occhiodoro, T., Morel, P., Lou, J., and Trono, D. (2000). Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther* 2, 404-414.
- Sambrook J, Russell DW. (2006) Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep. *CSH Protoc.* pii: pdb.prot4084
- Scherer LJ, Yildiz Y, Kim J, Cagnon L, Heale B, Rossi JJ (2004) Rapid assessment of anti-HIV siRNA efficacy using PCR-derived Pol III shRNA cassettes. *Mol Ther.*;10(3):597-603.
- Schubert U, Ferrer-Montiel AV, Oblatt-Montal M, Henklein P, Strebel K, Montal M. (1996) Identification of an ion channel activity of the Vpu transmembrane domain and its involvement in the regulation of virus release from HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.*;398(1):12-8.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.*;115(2):199-208.
- Sharma, A., Naziruddin, B., Cui, C., Martin, M. J., Xu, H., Wan, H., Lei, Y., Harrison, C., Yin, J., Okabe, J., et al. (2003). Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation* 75, 430-436.
- Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. (2007) The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol.*;8(3):239-45
- Shaunak S and Weber JN. (1992) The retroviruses: classification and molecular biology. *Baillieres Clin Neurol* 1: 1-21.
- Sifuentes-Romero I, Milton SL, García-Gasca A. (2011) Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: where do we stand? *Mutat Res.*;728(3):158-71
- Speers WC et al. (1980) Silent infection of murine embryonal carcinoma cells by Moloney murine leukemia virus. *Virology* 105: 241-244.
- Spriggs S, Garyu L, Connor R, Summers MF. (2008) Potential intra- and intermolecular interactions involving the unique-5' region of the HIV-1 5'-UTR. *Biochemistry.* 47(49):13064-73.
- Starcich B et al. (1985) Characterization of long terminal repeat sequences of HTLV-III. *Science*,227: 538-540.
- Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. (2003) Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA.*;9(4):493-501.
- Swanstrom R and Wills JW. (1997) Synthesis, assembly and processing of viral protein. In: Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE, eds. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Press, 263–334;1997.
- Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. (2004) Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol.*;22(5):589-94.
- Teich NM et al. (1977) Virus infection of murine teratocarcinoma stem cell lines. *Cell* 12: 973-982.
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M, Verma IM. (2003) A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.*;100(4):1844-8.
- Tijsterman M, Plasterk RH. (2004) DICER at RISC; the mechanism of RNAi, *Cell* ;117(1):1-3
- Tuschl T, Borkhardt A. (2002) Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv.*;2(3):158-67
- Ullu E, Tschudi C, Chakraborty T. (2004) RNA interference in protozoan parasites. *Cell Microbiol.*(6):509-19
- Vermeire J, Vanbillemont G, Witkowski W, Verhasselt B. (2011) The Nef-infectivity enigma: mechanisms of enhanced lentiviral infection. *Curr HIV Res.*;9(7):474-89
- Volsky DJ, Potash MJ, Simm M, Sova P, Ma XY, Chao W, Shahabuddin M. (1995) The human immunodeficiency virus type 1 vif gene: the road from an accessory to an essential role in human immunodeficiency virus type 1 replication. *Curr Top Microbiol Immunol.*;193:157-68
- Wall RJ. (1996) Transgenic livestock - progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45:57-68.
- Watanabe S, Misawa M, Matsuzaki T, Sakurai T, Muramatsu T, Yokomine TA, Sato M (2008) Production and characterization of transgenic mice systemically expressing endo-beta-galactosidase C. *Glycobiology.*;18(1):9-19
- Whitelaw, C. B. (2004). Transgenic livestock made easy. *Trends Biotechnol* 22, 157-159; discussion 159-160.
- Whitelaw, C. B., Radcliffe, P. A., Ritchie, W. A., Carlisle, A., Ellard, F. M., Pena, R. N., Rowe, J., Clark, A. J., King, T. J., and Mitrophanous, K. A. (2004). Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett* 571, 233-236.
- Wu G, Pfeiffer S, Schröder C, Zhang T, Nguyen BN, Kelishadi S, Atkinson JB, Schuurman HJ, White DJ, Azimzadeh AM, Pierson RN 3<sup>rd</sup> (2007) Coagulation cascade activation triggers early failure of pig hearts expressing human complement regulatory genes. *Xenotransplantation.*;14(1):34-47.
- Wu, A. M., Wu, J. H., Song, S. C., and Kabat, E. A. (1996). Bandeira (Griffonia) simplicifolia lectin-I, isolectin A4, reacting with Tn (GalNAc alpha1 --> Ser/Thr) or galabiose (Gal alpha1 --> 4Gal) containing ligands. *FEBS Lett* 398, 183-186.
- Wyatt R and Sodroski J. (1998) The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280: 1884-1888.

- Zennou V et al. (2001) The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol* 19: 446-450.
- Zernicka-Goetz M et al. (1997) Following cell fate in the living mouse embryo. *Development* 124: 1133-1137.
- Zhu M, Wang SS, Xia ZX, Cao RH, Chen D, Huang YB, Liu B, Chen ZK, Chen S. (2005) Inhibition of xenogeneic response in porcine endothelium using RNA interference. *Transplantation*;79(3):289-96.
- Zhu M, Zhang W, Liu F, Wang L, Liu B, Chen D, Zhu XH, Zhang WJ, Ichim TE, Chen ZS, Zhou P, Chen S, Chen G. (2008) Resistance to anti-xenogeneic response by combining alpha-Gal silencing with HO-1 upregulation. *Transpl Immunol*;19(3-4):202-8
- Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res.* 31:3406-3415.
- Zufferey R et al. (1999) Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73: 2886-2892.
- Zufferey R et al. (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 72: 9873-9880.
- Zufferey R et al. (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* 15: 871-875.
- [http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216\\_WorldAIDSday\\_report\\_2011\\_en.pdf](http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/unaidspublication/2011/JC2216_WorldAIDSday_report_2011_en.pdf)

## 8. Lebenslauf und Referenzen

### Lebenslauf:

1981	geboren in Wittenberg, Deutschland
1999	Abitur am Paul-Gerhardt-Gymnasium in Gräfenhainichen
1999-2004	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Hauptstudium, Spezialisierungspraktika am Max von Pettenkofer Institut München) und an der Martin-Luther-Universität Halle (Grundstudium)
2004-2005	Studiumabschluss Diplom-Biologin Univ., Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Institut für Biochemie); Thema: Generation of recombinant lentiviruses encoding siRNAs directed against the 37 kDa/67 kDa laminin receptor mRNA for treatment of prion diseases
2005-2009	Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Institut für Chemie und Pharmazie) und der Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung Virale Vektoren); Thema: Lentivirale Vektoren und RNAi für den Einsatz in der Xenotransplantation
seit 2010	Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Daiichi Sankyo Deutschland GmbH, Hauptgebiet Hypertonie und Akutes Koronarsyndrom

### Referenzen Vorträge:

Messow D, Hofmann A, Kessler B, Wolf E, Pfeifer A (2006)  
 Targeting of Porcine  $\alpha$ -Galactosyltransferase by RNA Interference.  
 DFG-Transregio Research Group Xenotransplantation and 9th Minisymposium Xenotransplantation of the German Working Group Xenotransplantation (DAX), Juni 2006, Berlin, Deutschland.  
 XENOTRANSPLANTATION 13 (6): 581-582 NOV 2006

### Referenzen Poster:

Messow D, Hofmann A, Kessler B, Schwinzer R, Wolf E, Pfeifer A (2007)  
 Knock-down of porcine  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase using lentiviral RNAi  
 Semestertreffen des Bonner Forums Biomedizin, Februar 2007, Bad Breisig 2007

Messow D, Hofmann A, Kessler B, Schwinzer R, Wolf E, Pfeifer A (2007)  
 Knock-down of porcine  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase using lentiviral RNAi  
 48. Frühjahrstagung der DGPT, März 2007, Mainz, Deutschland.  
 Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 2007 Mar; 375(Suppl. 1)

Messow D, Hofmann A, Kessler B, Schwinzer R, Wolf E, Pfeifer A (2007)  
 Knock-down of porcine  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase using lentiviral RNAi  
 Joint Meeting of the International Xenotransplantation Association (IXA), the International Pancreas and Islet Transplant Association (IPITA), and the Cell Transplant Society (CTS), Minneapolis, MN, USA, September 15th–20th, 2007; Xenotransplantation 14 (5): 462-463 SEP 2007